

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ROBERTA ALMEIDA MENDES

**CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS:
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, BIOATIVIDADE E
MIGRAÇÃO CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO**

Porto Alegre

2019

ROBERTA ALMEIDA MENDES

**CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS:
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, BIOATIVIDADE E
MIGRAÇÃO CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Soares Grecca Vilella

Porto Alegre

2019

ROBERTA ALMEIDA MENDES

**CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS:
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, BIOATIVIDADE E
MIGRAÇÃO CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Soares Grecca Vilella

Porto Alegre, 04 de julho de 2019

Fabiana Soares Grecca Vilella
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fernanda Visioli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Simone Bonato Luisi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família, que sempre esteve ao meu lado, apoiando e encorajando. À minha mãe, que acreditou em mim mais do que eu mesma; ao meu pai, que ouviu incansáveis histórias da faculdade; à minha irmã, que mesmo longe participou de toda essa conquista, ajudando até a memorizar as palavras pré-provas. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês fizeram isso acontecer e sou completamente grata por isso. Essa conquista é nossa!

À minha professora orientadora, Fabiana Grecca, meu muito obrigado por ter me dado a oportunidade de uma bolsa de Iniciação Científica e por ter acreditado e apostado em mim para executar um papel tão importante na área da pesquisa. Ajudou-me a amadurecer e ver a Odontologia com outros olhos, sempre me incentivando a crescer. Você foi fundamental nessa trajetória.

A todos os professores que em algum momento me fizeram ver que todo o esforço valia a pena. A todos os meus amigos e colegas que estiveram do meu lado durante esses cinco anos me apoiando. Em especial, à minha colega Bruna Bittencourt, uma amiga e confidente, que está sempre pronta para me ouvir após um dia exaustivo de atendimentos e desafios. À equipe de Endodontia, em especial à Gabriela Cardoso, Lucas Pinheiro e a Marina Aspesi, que dividiram momentos importantes comigo e fizeram eu me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço à Leticia Mestieri, que me fez criar um amor pelas células, além de me ensinar muito e encorajar diversas vezes. Quando eu ficava insegura, tu me dizias que acreditava em mim e que sabia que eu conseguiria, palavras as quais levarei comigo. Sempre pronta para me ouvir e ajudar, tornou-se uma grande amiga.

Quero agradecer também à equipe de Patologia da UFRGS, que cedeu o laboratório de Patologia para que essa e outras pesquisas fossem desenvolvidas, além de estar sempre à disposição para eventuais dúvidas e ajudas. À professora Simone Luisi, que ajudou a “abrir as portas” da Endodontia para mim desde a disciplina de pré-clínica, com toda sua paciência e carinho, até aquele “empurrãozinho” com a bolsa de Iniciação Científica.

Por último, e não menos importante, gostaria de agradecer a Deus e ao meu anjo da guarda, por me iluminarem sempre e me ajudarem a seguir os caminhos corretos. Sinto-me abençoada por todas as oportunidades e por chegar aonde cheguei. Eternamente grata por estar realizando esse sonho.

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.” (Charles Chaplin)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas dos cimentos endodônticos biocerâmicos Sealer Plus BC e MTA Fillapex, e dos cimentos à base de resina epóxi Sealer Plus e AH Plus em cultura de células-tronco da papila dentária humana. Os cimentos foram manipulados e colocados em contato com meio de cultura para confecção de extratos na concentração de 10%. Foi utilizado o meio de cultura DMEM como controle negativo. Foram realizados ensaios de MTT e SRB para avaliar a viabilidade celular, o ensaio de Scratch para avaliar a taxa de migração celular. Para avaliar a bioatividade dos cimentos, foi avaliada a atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (ALP), considerando um marcador odontoblástico e osteoblástico, e a coloração de Alizarin Red (ALZ), o qual identifica depósitos de cálcio na cultura celular. Todos os resultados obtidos foram paramétricos, sendo utilizado o teste One-way ANOVA e post hoc de Tukey e o teste T, por meio do *software* GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, 2012), sendo considerado o nível de significância de 5%. Todos os cimentos estudados apresentaram viabilidade celular para os testes de MTT e SRB. Para o ensaio de migração celular, os cimentos Sealer Plus BC e MTA Fillapex obtiveram o completo fechamento da ferida no período de 48h, o Sealer Plus e o AH Plus não obtiveram o fechamento nas 72h de estudo, com alteração da morfologia celular para o AH Plus. Para os resultados de bioatividade, o ensaio de ALP mostrou que no período experimental de 24h, o Sealer Plus e o MTA Fillapex apresentaram valores significativamente menores em relação ao controle, no período de 7 dias, apenas o Sealer Plus apresentou uma menor bioatividade que o controle e aos 14 dias, todos os materiais estudados foram semelhantes ao controle, o ensaio de ALZ mostrou presença de nódulos mineralizados em todos os cimentos, sem formação para o grupo controle. Em conclusão, todos os materiais foram viáveis e apresentaram resposta positiva em relação à bioatividade, com destaque para o Sealer Plus BC. A taxa de migração celular foi maior para os cimentos Sealer Plus BC e MTA Fillapex.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Cultura de células. Endodontia. Migração celular. Viabilidade celular.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the biological properties of the bioceramic endodontics sealers Sealer Plus BC and MTA Fillapex and of epoxy-resin based sealers Sealer Plus and AH Plus in cell culture of the dental apical papilla. The sealers were manipulated and placed in contact with culture medium for preparation of extract at 10% concentration. The DMEM culture medium was used as the negative control. MTT and SRB assays were performed to evaluate the cell viability, the Scratch assay to evaluate the rate of cell migration. To evaluate the sealers bioactivity, the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) was used, considering an odontoblastic and osteoblastic marker, and coloration of Alizarin Red (ALZ), which identifies deposits of calcium and phosphatase in the cell culture. All the results obtained were parametric, using One-way ANOVA and post-hoc the Tukey test and T-test, using the GraphPadPrism 5 software (GraphPad Software, 2012), it was considered the level of significance of 5%. All the studied materials presented cell viability for the MTT and SRB tests. For the cell migration assay, Sealer Plus BC and MTA Fillapex sealers obtained complete wound closure within 48 hours, Sealer Plus and AH Plus did not obtain closure within 72 hours of study, with alteration of cellular morphology for AH Plus. For the bioactivity results, the ALP assay showed in the 24 hour experimental period, Sealer Plus and MTA Fillapex showed significantly lower values in relation to the control, in the period of 7 days, only Sealer Plus presented a lower bioactivity then the control and at 14 days, all the sealers studied were similar to the control group. The ALZ assay showed the presence of mineralized nodules in all sealers, with no formation for the control group. In conclusion, all materials were viable and presented a positive response concerning bioactivity, with emphasis on Sealer Plus BC. The cell migration rate was higher for Sealer Plus BC and MTA Fillapex sealers.

Key-words: Biocompatibility. Cell culture. Cell viability. Cell migration. Endodontics.

SUMÁRIO

1	ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	08
2	OBJETIVO.....	11
3	METODOLOGIA.....	12
3.1	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	14
3.1.1	<i>Ensaio de viabilidade – MTT.....</i>	14
3.1.2	<i>Ensaio de viabilidade – SRB.....</i>	14
3.2	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO.....	15
3.2.1	<i>Ensaio de cicatrização de feridas – Scratch.....</i>	15
3.3	AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE.....	16
3.3.1	<i>Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP).....</i>	16
3.3.2	<i>Avaliação do potencial de mineralização (ALZ).....</i>	16
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4	RESULTADOS.....	18
4.1	VIABILIDADE CELULAR.....	18
4.2	CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	19
4.3	BIOATIVIDADE CELULAR.....	21
5	DISCUSSÃO.....	22
6	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26
	ANEXO A – Aprovação da Comissão de Pesquisa (COMPESQ).....	29
	ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética.....	31
	ANEXO C – Autorização do Laboratório de Patologia.....	34

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Com a evolução da Odontologia, os materiais vêm se aprimorando cada vez mais. Diante disso, os cimentos à base de silicato de cálcio, denominados biocerâmicos, vêm sendo utilizados na Endodontia visando boas propriedades biológicas, além das físico-químicas e mecânicas, ideais para obturação do sistema de canais radiculares (1) e como cimento reparador na cirurgia paraendodôntica, recobrimento pulpar e tratamento de perfurações (2, 3). Desse modo, novos cimentos biocerâmicos estão sendo lançados no mercado.

Na Endodontia, os materiais biocerâmicos apresentam propriedades como pH alcalino, atividade antibacteriana, radiopacidade, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, não sofrem contração volumétrica, são quimicamente estáveis e possuem facilidade de manuseio (4). O diferencial deste material é a sua bioatividade, ou seja, é capaz de interagir com tecidos vivos, resultando na formação de uma camada de apatita e biomineralização na interface material-tecido (4, 5).

O Sealer Plus BC (MK Life, Porto Alegre, RS, Brazil) é um cimento biocerâmico, recentemente lançado no mercado, sendo uma mistura pronta, em pasta. Sua composição consiste em silicato tri-cálcico, silicato di-cálcico, óxido de zircônio, hidróxido de cálcio e propilenoglicol. Segundo o fabricante, é um cimento insolúvel, radiopaco, altamente hidrofílico, alcalino, com excelente fluidez e escoamento e possui fácil manipulação. Em um estudo recente para avaliar suas propriedades físico-químicas, o Sealer Plus BC mostrou maior pH e maior liberação de íons cálcio do que o cimento AH Plus; entretanto, o tempo de presa final, o escoamento e a radiopacidade foram menores que os obtidos pelo AH Plus (6). Entretanto, este cimento não possui ainda estudos de biocompatibilidade *in vitro* ou *in vivo*. Além disso, comparações entre cimentos biocerâmicos e outros cimentos endodônticos já utilizados clinicamente, nos permitem uma melhor avaliação dos novos materiais.

O MTA Fillapex (Angelus S/A, Londrina, PR, Brazil) é um cimento à base de Agregado Trióxido Mineral (MTA) desenvolvido na tentativa de se associar as propriedades físico-químicas de um cimento obturador a base de resina com as boas propriedades biológicas do MTA. Sua composição consiste de silicatos de cálcio, resina salicilato, resina diluente, resina natural, sílica nanoparticulada e pigmentos. Em uma revisão de literatura sobre cimentos à base de silicato de cálcio,

em estudos de biocompatibilidade e bioatividade com células osteoblásticas, o MTA Fillapex mostrou possuir efeitos citotóxicos nos primeiros períodos de contato, aumentando a viabilidade e a bioatividade com o passar do tempo (7).

O Sealer Plus (MK Life, Porto Alegre, RS, Brazil) é um cimento a base de resina epóxi, que apresenta na sua composição hidróxido de cálcio, óxido de zircônio, silicone e siloxanos, óxido de ferro, hexametilenotetramina, tungstato de cálcio. Segundo o fabricante, possui excelente viscosidade que facilita a penetração e selamento dos canais laterais. Além disso, possui baixa contração de presa, evitando espaço entre o cimento e a parede do canal radicular.

O Sealer Plus apresentou uma maior viabilidade celular em todas as diluições (1/1, 1/2, 1/4) e períodos (6h, 24h, 48h, 72h) quando comparado aos cimentos AH Plus, Endofil e Simpliseal, com exceção da diluição de 1/4 nos períodos de 6h e 72h, no qual o Simpliseal e o Endofil obtiveram maior viabilidade, respectivamente. Os autores sugerem que a maior viabilidade do Sealer Plus está relacionada à presença de hidróxido de cálcio na sua composição, devido à capacidade de induzir uma menor toxicidade (8).

Os cimentos que possuem hidróxido de cálcio têm a capacidade de se dissociar em íons cálcio e hidroxila, que levam ao aumento do pH, ação antibacteriana e induzem a formação do tecido mineralizado. Os íons cálcio reagem com o dióxido de carbono presente no tecido e formam os cristais de calcita, que são importantes para o início da calcificação (9, 10).

O AH Plus (Dentsply, York, PA, USA) é um cimento a base de resina epóxi, além disso, apresenta na sua composição tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óxido de ferro, amina e óleo de silicone. Segundo o fabricante possui excelente biocompatibilidade e radiopacidade, possui fácil manipulação, baixa contração, alta estabilidade, propriedades auto-adesivas (proporcionando alta adesividade à dentina), maior tempo de trabalho e tolera calor não perdendo suas propriedades químicas durante a termoplastificação. Os materiais que contém em sua composição resina epóxi possuíram um grau de citotoxicidade e uma inflamação severa; no entanto, o cimento AH Plus é considerado o padrão ouro como selante devido as suas ótimas propriedades físico-químicas (8).

Quando se comparou o AH Plus aos cimentos MTA Fillapex e o TotalFill BC Sealer, o AH Plus apresentou um nível de proliferação celular significativamente maior que o MTA Fillapex, porém sem diferença para o TotalFill BC Sealer (11). O

MTA Fillapex foi o cimento que apresentou maior citotoxicidade comparado aos outros materiais endodônticos testados (Endomethasone, EndoSequence BC, Pulp Canal Sealer), porém não mostrou diferença estatística em relação do AH Plus (12).

Cada etapa clínica pode resultar no sucesso ou no insucesso do tratamento endodôntico. Dessa maneira, para se obter um bom prognóstico, é necessário, além de um adequado preparo químico-mecânico, uma boa seleção do material obturador. Durante a obturação do sistema de canais radiculares, o cimento endodôntico pode extruir através do ápice radicular ou até mesmo através de um canal lateral ou acessório podendo ficar em contato direto com os tecidos periapicais por um período prolongado de tempo (3, 11, 12).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são de extrema importância para avaliar os riscos biológicos destes materiais, principalmente na fase inicial (13). Dessa forma, os testes de citotoxicidade permitem eliminação de alguns materiais já no primeiro momento da pesquisa (14). Já, o teste de bioatividade é importante para avaliar o efeito biológico de novos biomateriais (15). A proliferação celular e a migração foram indispensáveis para o desenvolvimento tecidual e cicatrização de feridas (16).

Diversos estudos têm demonstrado que as células da papila dentária apical (SCAPs) em condições apropriadas, podem se diferenciar em osteoblastos e odontoblastos *in vitro* e são capazes de formar tecido ósseo e dentina *in vivo* (16). Linhagens de SCAPs normalmente estão presentes próximas ao ápice radicular. Tem se observado uma maior diferenciação em células odontoblásticas se comparado a outras células-tronco dentárias (17). Ainda, quando comparado seus potenciais, as células da papila apical e do folículo possuíram maior potencial proliferativo. As células-tronco dentárias são capazes de se diferenciar em múltiplas linhagens, incluindo células osteogênicas. Com base nisso, essas células-tronco dentárias podem ser uma fonte valiosa para auxiliar na regeneração tecidual dentárias e periodontais (18).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas dos cimentos endodônticos a base de silicato de cálcio Sealer Plus BC e MTA Fillapex e a base de resina Sealer Plus e AH Plus em cultura de células de papila dentária.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como **objetivo geral** comparar a citotoxicidade, bioatividade e migração celular, em células-tronco obtidas da papila dentária humana (SCAPs), dos cimentos endodônticos à base de resina epóxi AH Plus e Sealer Plus e dos cimentos biocerâmicos MTA Fillapex e Sealer Plus BC.

Os **objetivos específicos** deste estudo foram:

- Avaliar a citotoxicidade dos cimentos endodônticos em células-tronco obtidas da papila dentária humana (SCAPs), por meio dos ensaios de MTT e SRB.
- Avaliar a bioatividade, em cultura de células-tronco obtidas da papila apical humana (SCAPs) por meio do ensaio da Fosfatase Alcalina e Alizarin Red.
- Avaliar a taxa de migração celular de células-tronco (SCAPs) expostas aos diferentes cimentos endodônticos, através do ensaio de cicatrização de feridas (“scratch”).

3 METODOLOGIA

Considerações éticas

O projeto foi encaminhado a Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia (COMPESQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com aprovação em 19/04/2018 sob o n. 34629 (Anexo A). A linhagem celular utilizada foi adquirida para a pesquisa intitulada “Avaliação da citotoxicidade e bioatividade de culturas primárias do órgão dentário frente a novos materiais endodônticos.” com aprovação do comitê de ética em 28/05/2015 sob n.1.112.946 (Anexo B).

Delineamento do estudo

Estudo experimental, *in vitro*, cego e randomizado.

Local de Realização da Pesquisa

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS (Anexo C).

Cultura de células

Células da papila apical dentária (SCAPs), coletadas de terceiros molares de dois pacientes com rizogênese incompleta, foram caracterizadas em células-tronco por citometria de fluxo através de biomarcadores específicos (marcadores de superfície de células tronco, CD146 e CD105 e marcadores para células hematopoiéticas, CD45 e CD14). As células na sétima passagem estavam congeladas e mantidas em nitrogênio até o momento do atual estudo. As SCAPs foram descongeladas e passaram por um processo de centrifugação para eliminação do meio criogênico (10% DMSO – Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich e 90% FBS – Soro Fetal Bovino, Gibco) e cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), e 1% de penicilina e streptomina (PenStrep, Gibco) em frascos próprios para cultura celular T-75 (TPP - Techno PlasticProducts, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça). A cultura foi mantida à temperatura de 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade até atingir 80% de confluência, aproximadamente 72h após o descongelamento. Nesta fase, as células

em monocamada foram tripsinizadas por tratamento durante 3 a 5 minutos com uma solução de Tripsina + EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) encubadas em estufa à 37°C. Em seguida, foram coletadas em tubos tipo Falcon de 15 mL (TPP), centrifugadas para remoção da solução de Tripsina + EDTA 0,25%, diluídas no meio de cultura DMEM e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram plaqueadas de acordo com a necessidade de concentração de células/poço em placas individuais de cultura celular de acordo com os experimentos descritos abaixo.

Confecção dos extratos de cimentos

Os cimentos (Tabela1) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, em placas de vidro estéreis, utilizando uma espátula 24 (Duflex, SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), com exceção do Sealer Plus BC que é uma mistura pronta em pasta. Após o preparo, os materiais inseridos em poços de uma placa de cultura de 12 poços (TPP - Techno PlasticProducts, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça), de maneira a preencher todo o fundo do poço, e após foi adicionado meio de cultura DMEM (volume/poço 6,30ml) e a placa foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para se obter as soluções de extratos que foram filtradas antes de serem utilizadas.

Os cimentos testados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Cimentos avaliados nos experimentos

MATERIAL	REFERÊNCIA
MTA Fillapex (MF)	Angelus S/A, Londrina, PR, Brazil
Sealer Plus BC (BC)	MK Life, Porto Alegre, RS, Brazil
Sealer Plus (SP)	MK Life, Porto Alegre, RS, Brazil
AH Plus (AH)	Dentsply, York, PA, USA

Fonte: o autor

3.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR FRENTE AOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Para os ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular, as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços (TPP) (n= 10 poços para cada material) para realização dos experimentos. Os ensaios foram realizados em diluições de 10% (extrato diluído em meio de cultura), totalizando 100 μ L por poço.

Todos os ensaios foram realizados utilizando meio de cultura DMEM como controle negativo. E o experimento de MTT foi executado nos períodos de 24 e 72 horas e o SRB no período de 72 horas.

3.1.1 Ensaio de viabilidade – MTT

O ensaio MTT avalia a atividade da enzima succinatodesidrogenase mitocondrial em células vivas, através da redução do corante do sal de brometo difenil-tetrazólio (MTT), formando cristais violetas insolúveis de formazan, cuja absorção é proporcional a quantidade de células vivas (15). Logo, apenas as células vivas, com atividade mitocondrial normal, têm a capacidade de clivar o sal amarelo e reduzi-lo ao produto violeta (14). Após a exposição das células aos extratos dos cimentos endodônticos nos períodos de 24 e 72 horas, foi adicionado 10 μ L da solução de MTT (Sigma-Aldrich) na concentração 5 mg/mL, seguido de incubação por 3h a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após o período de incubação, o conteúdo do poço foi removido e o produto colorimétrico formazan solubilizado em 100 μ L de isopropanol acidificado 0,04 N (Sigma-Aldrich). As amostras contendo o formazan solubilizado foram quantificadas por espectrofotometria a 570 nm em leitor de ELISA (Thermo Fischer Scientific in, Waltham, Massachusetts) (19).

3.1.2 Ensaio de viabilidade – SRB

O ensaio SRB atua como marcador de proteínas das células viáveis. Após exposição das células aos extratos dos cimentos endodônticos avaliados pelo período de 72 horas, as células foram fixadas com 25 μ L (solução 50%) de ácido tricloroacético (TCA) 10% por uma hora em ambiente refrigerado (4°C) para fixação

das células, após esse período a placa foi lavada em água corrente e foi aguardada cerca de 24h para completa secagem da placa em temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas com 100µl do corante SRB 0,4% (Sigma-Aldrich) e a placa incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, e então, foi lavada com 1% de ácido acético para remover o excesso de corante e aguardada novamente a completa secagem da placa. Após, a placa foi solubilizada em solução de Tris 1% (Sigma-Aldrich) e as amostras foram quantificadas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 560nm. Os resultados foram expressos em relação ao controle negativo (20).

3.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR FRENTE AOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

3.2.1 Ensaio de Cicatrização de Feridas – “Scratch”

O ensaio consiste em criar uma ferida e mensurar a taxa de migração das células. Para tal, foram utilizadas duas placas de cultura de 12 poços (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) e as células foram plaqueadas em uma concentração de 3×10^5 células/poço. Após 48 horas de incubação a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade e as células já confluentes em monocamada, foi realizado um arranhão feito no sentido horizontal e outro no sentido vertical (risco cruzado) com o uso de uma ponta de pipeta P10 (TPP). O meio de cultura foi aspirado e foi colocado 1mL de solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) para lavar e eliminar as células que foram desprendidas durante a confecção da ferida. O PBS foi aspirado e 1mL de cada extrato dos cimentos estudados na concentração de 10% foi adicionado em cada poço. A partir deste momento, as placas foram levadas ao microscópio invertido Axio Observer Z1 (Zeiss, Göttingen, Alemanha) com uma câmera fotográfica acoplada (AxioCam mrm, Zeiss, Göttingen, Alemanha) usando uma objetiva de 10x (abertura Eclan-Neofluar 10x / 0.3 Zeiss, Göttingen, Alemanha) e imagens foram capturadas no primeiro período e a cada 6 horas durante 72 horas. Imagens de migração celular foram analisadas usando o Software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD).

3.3 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE CELULAR FRENTE AOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Para os ensaios de bioatividade celular, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células/poço (500 μ L da suspensão de células por poço) em placas de 24 poços (TPP) para realização dos experimentos. Os ensaios de bioatividade foram realizados na diluição de 10% (extrato diluído em meio de cultura), totalizando 500 μ L de extrato por poço em todos os ensaios. Para os períodos de 7 e 14 dias foram trocados os meios contendo os extratos a cada 3 dias, para manutenção celular. Foram utilizados como controle negativo, células cultivadas em meio de cultura DMEM completo.

3.3.1 Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP)

A enzima ALP foi utilizada como marcador da atividade osteoblástica e odontoblástica por meio do ensaio laboratorial que avalia a atividade desta enzima (Fosfatase Alcalina, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil). A atividade ALP foi avaliada de acordo com a liberação de timolftaleína através do monofosfato de timolftaleína usando o kit da fosfatase alcalina (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil). Após a exposição das células aos extratos dos cimentos endodônticos avaliados pelos períodos de 1, 7, 14 dias, as mesmas foram lisadas com 500 μ L de solução de Tris 1% (Sigma-Aldrich) e o experimento foi realizado de acordo com o protocolo descrito no kit. A absorbância foi mensurada em um $n=10$ por espectrofotometria em placa de 96 poços (TPP) no comprimento de onda de 590 nm em leitor de ELISA (21). Os dados foram obtidos através do cálculo descrito no manual do laboratório:

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 45$$

3.3.2 Avaliação do potencial de mineralização (ALZ)

Para a verificação da presença de mineralização, as células foram cultivadas por 14 dias em meio de cultura contendo os extratos dos cimentos. Neste período,

elas foram fixadas por 10 minutos em solução de formaldeído 10% (Sigma-Aldrich) e coradas durante 20 minutos com o corante AlizarinRed S (Sigma-Aldrich) a 2% (pH 4.2). Após, o corante foi aspirado e os poços foram lavados com água destilada. Em seguida, foi adicionado cloreto de cetilpiridínio 10% (Sigma-Aldrich) para solubilização dos nódulos por 15 minutos e a amostra foi transferida para uma placa de 96 poços (TPP), onde a absorbância foi medida através do leitor de ELISA em um comprimento de onda de 562 nm (22).

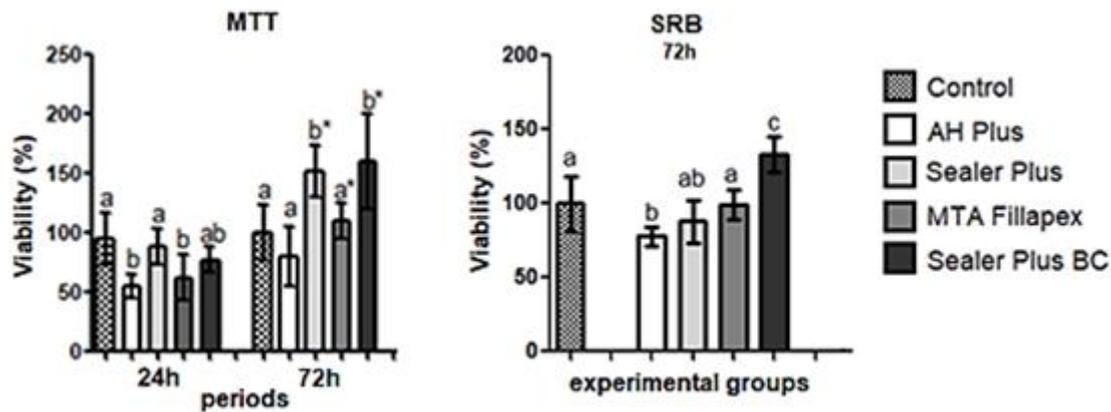
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, indicando dados paramétricos. Os testes One-way ANOVA e post hoc de Tukey para comparações estatísticas entre os diferentes materiais experimentais e o teste T para comparações entre o mesmo material em dois períodos distintos foram utilizados. Foi utilizado o *software* GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, 2012), sendo considerado o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 VIABILIDADE CELULAR

Figura 1 – Ensaio de MTT e SRB



Fonte: o autor

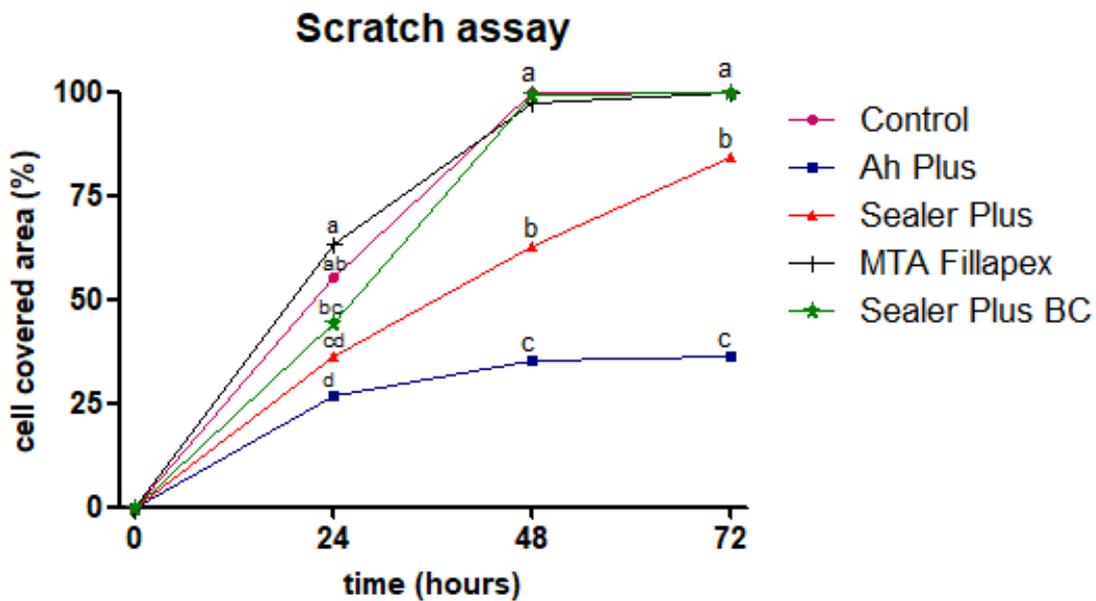
Legenda: MTT - Porcentagem de viabilidade celular dos materiais reparadores na concentração de 10% por meio do teste de MTT nos períodos de 24 e 72h. Letras diferentes representam diferença estatística entre os materiais no mesmo período ($p \leq 0,05$). SRB - Porcentagem de viabilidade celular dos materiais reparadores na concentração de 10% por meio do teste de SRB no período de 72h. Letras diferentes representam diferença estatística entre os materiais na mesma concentração ($p \leq 0,05$).

No ensaio de MTT no período de 24 horas, o Sealer Plus BC e o Sealer Plus foram semelhantes ao controle, o MTA Fillapex e AH Plus apresentaram menor viabilidade que o grupo controle ($p \leq 0,05$). No período de 72 horas, o AH Plus e o MTA Fillapex foram semelhantes ao grupo controle, e o Sealer Plus e o Sealer Plus BC obtiveram melhores resultados, demonstrando diferença estatística em relação aos demais grupos ($p \leq 0,05$) (Figura 1).

No ensaio de SRB, o Sealer Plus BC obteve melhor viabilidade sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p \leq 0,05$). O AH Plus apresentou a menor porcentagem de viabilidade quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$) (Figura 1).

4.2 CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR

Figura 2 – Ensaio de Scratch

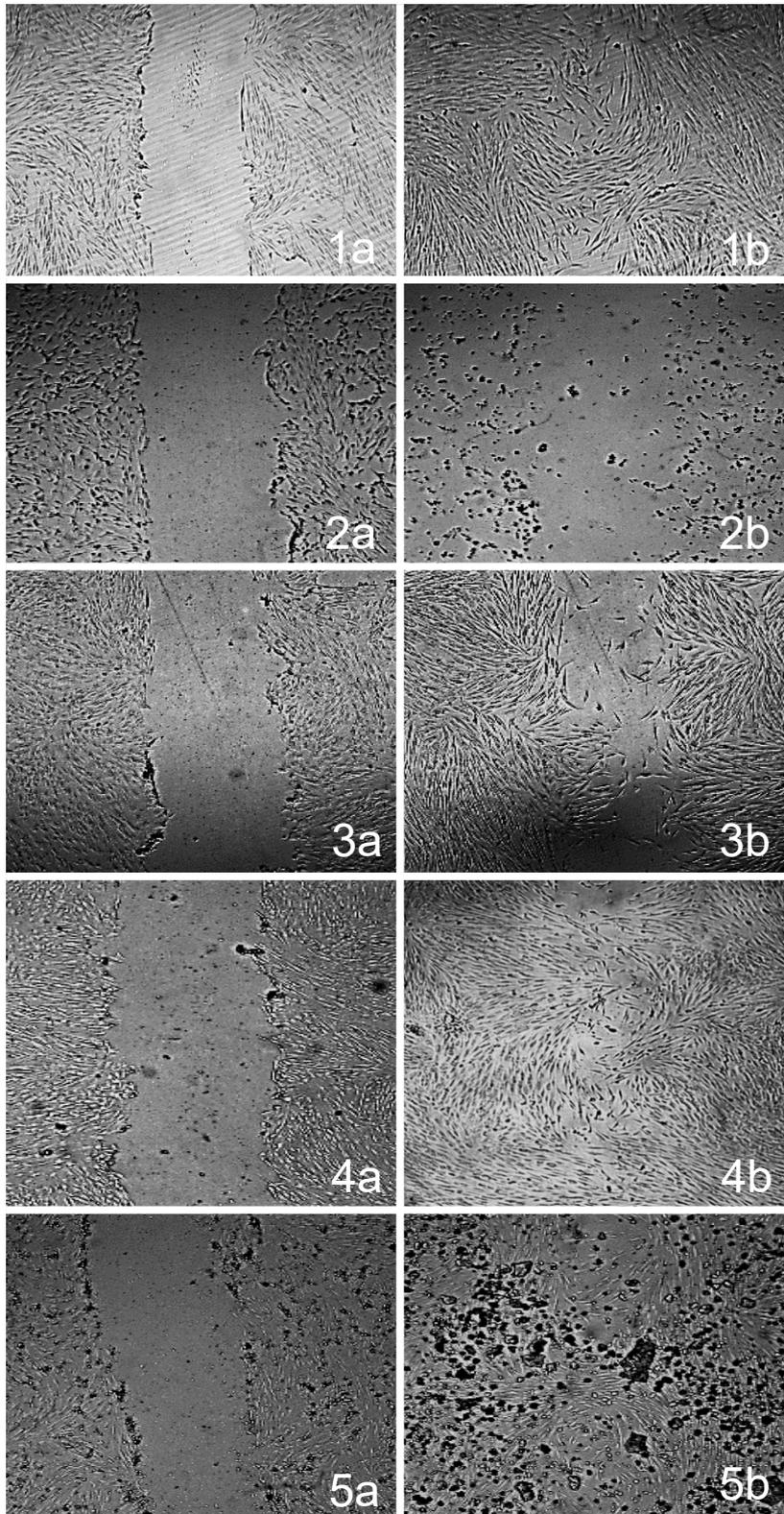


Fonte: o autor

Legenda: Avaliação do fechamento da ferida feita através do ensaio Scratch para os materiais estudados na concentração de 10%. Letras diferentes representam diferença estatística entre os materiais no mesmo período ($P \leq 0,05$).

Para determinar a taxa de migração celular, foi utilizado um ensaio de cicatrização *in vitro*. No período de 24 horas, houve uma resposta de migração celular para todos os materiais estudados. No período de 48 horas, o MTA Fillapex, o Sealer Plus BC e o grupo controle promoveram maior taxa de migração celular e o fechamento total da área. Após 72 horas do período experimental, o AH Plus e o Sealer Plus não apresentaram cicatrização ($p \leq 0,05$) (Figura 2 e 3).

Figura 3 – Imagens fotográficas do Ensaio de Scratch

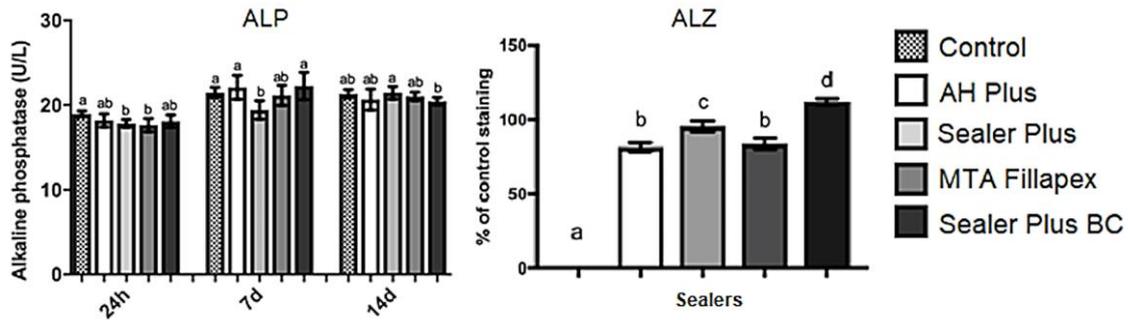


Fonte: o autor

Legenda: Imagem microscópica do ensaio de Scratch ilustra a confecção da ferida na monocamada de células confluentes no período inicial e no período final de 72 horas, referentes ao grupo controle e aos quatro materiais experimentais (1 – Control, 2 – AH Plus, 3 – Sealer Plus, 4 – MTA Fillapex, 5 – Sealer Plus BC).

4.3 BIOATIVIDADE CELULAR

Figura 4 – Ensaio de ALP e ALZ



Fonte: o autor

Legenda: Ensaio da atividade enzimática da ALP nos diferentes períodos experimentais e da deposição de nódulos mineralizados pelo ALZ dos cimentos endodônticos na concentração de 10%. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os materiais no mesmo período experimental avaliado ($P \leq 0,05$).

Para a atividade da fosfatase alcalina, no período experimental de 24h, o Sealer Plus e o MTA Fillapex apresentaram valores significativamente menores em relação ao controle ($p \leq 0,05$). No período de 7 dias, apenas o Sealer Plus apresentou uma menor bioatividade que o controle ($p \leq 0,05$). Aos 14 dias, todos os materiais estudados foram semelhantes ao controle ($p \geq 0,05$) (Figura 4).

No ensaio ALZ, todos os materiais estudados apresentaram resposta positiva à formação de nódulos de mineralização, sendo que no grupo controle não houve formação. O Sealer Plus BC demonstrou a maior deposição de nódulos mineralizados em comparação aos outros cimentos endodônticos, seguido do Sealer Plus ($p \leq 0,05$). Os cimentos AH Plus e MTA Fillapex foram semelhantes, apresentando uma menor bioatividade (Figura 4).

5 DISCUSSÃO

A biocompatibilidade é uma das propriedades mais importantes dos materiais obturadores endodônticos e está diretamente relacionada à sua composição (8), visto que estes ficam em íntimo contato com o tecido periapical (10). Um material é considerado biocompatível quando ele entra em contato com o tecido e não causa uma reação adversa – como toxicidade, irritação, inflamação, alergia ou carcinogenicidade –, para isso estudos costumam avaliar esta propriedade através de ensaios de citotoxicidade, analisando o efeito do material na sobrevivência celular (23).

A avaliação simultânea de diferentes testes de viabilidade celular pode permitir a identificação mais precisa de eventuais efeitos citotóxicos causados pelos cimentos endodônticos (15). O ensaio de MTT avalia a proliferação celular – proporcional à quantidade de células vivas – através da capacidade da enzima mitocondrial de converter o sal de tetrazólio 3- (4,5-dimetil-tiazol) -2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) em compostos de formazan (19). O ensaio SRB atua como marcador de proteínas das células viáveis.

A mesma tendência de resultados foram observados para os ensaios MTT e SRB. Os materiais testados possuem características de viabilidade celular, tanto para o teste de respiração celular, quanto para a atividade proteica, visto que a ISO 10993-5 (2009) considera como materiais citotóxicos aqueles que apresentam valores de viabilidade abaixo de 70%.

Apesar de viáveis, o AH Plus e o MTA Fillapex obtiveram a menor resposta, provavelmente pela presença da resina epóxi e da resina salicilato, respectivamente. O MTA Fillapex apresentou menor viabilidade quando comparado aos cimentos Endomethasone, EndoSequence BC e Pulp Canal Sealer e foi semelhante ao AH Plus, os autores relacionaram à presença de componentes tóxicos como a resina salicilato, resina diluente e sílica na composição do MTA Fillapex (12). Ainda que os cimentos Sealer Plus e AH Plus apresentem resina epóxi como base, no ensaio de MTT, o Sealer Plus foi mais viável que o AH Plus, pois possui na sua composição hidróxido de cálcio, que causa um aumento do pH e induz uma menor citotoxicidade ao longo do tempo (8).

O elevado pH inicial dos materiais que apresentam silicato ou hidróxido de cálcio na composição pode ter causado uma maior toxicidade inicial quando se

compara os períodos de 24h e 72h no MTT. Com exceção do AH Plus, os outros cimentos estudados apresentaram uma melhora na viabilidade celular no período de 72h.

Os efeitos dos cimentos na migração celular foram analisados utilizando o método de Scratch. Após a criação de um gap artificial, chamado de “scratch”, as células na borda da lacuna recém-criada se moverão na tentativa de fechamento do “risco” até um novo contato célula-célula. A análise é feita através da captura de imagens após a confecção da ferida em intervalos regulares até o fechamento do gap (24). Esse método mimetiza, até certo ponto, a migração de células *in vivo*. Na endodontia, os principais resultados esperados do tratamento são os reparos teciduais periapical e apical (25).

No período de 48 horas, o MTA Fillapex e o Sealer Plus BC apresentaram o completo fechamento do gap. O Sealer Plus no período de 72 horas não obteve fechamento, já o AH Plus, além de não haver o fechamento da ferida, houve alteração da morfologia e morte celular.

Apesar de os cimentos à base de resina epóxi não terem realizado a completa migração celular no período experimental, o Sealer Plus obteve uma melhor taxa de migração comparado ao AH Plus, possivelmente por possuir na sua composição hidróxido de cálcio. Isso porque a liberação de íons cálcio é um fator importante para a sinalização celular, regulando funções essenciais para a ligação, migração, diferenciação e proliferação celular de células produtoras de tecido duro (26).

A bioatividade foi analisada através dos ensaios de fosfatase alcalina e alizarin red. O aumento da atividade da ALP ocorre nas células ósseas, como um marcador de estágio inicial na osteogênese, na qual tem sido amplamente utilizado para avaliar o potencial de células *in vitro*, além de indicar o potencial das células para diferenciação (27). Portanto, a avaliação desta enzima permite a determinação da bioatividade do material e seu potencial para promover o reparo com formação de tecido mineralizado (28). Os cimentos estudados não induziram o aumento da atividade da ALP quando comparado ao grupo controle.

O ensaio de Alizarin Red é usado para quantificar a deposição de nódulos mineralizados e neste estudo não foram detectados nódulos no grupo controle. Todos os cimentos estudados apresentaram a formação de nódulos, caracterizando a bioatividade dos materiais, com maior presença para o cimento Sealer Plus BC.

O Sealer Plus BC apresentou maior viabilidade, migração celular e bioatividade quando comparado aos outros cimentos estudados. O silicato dicálcico e o silicato tricálcico presente na sua composição são capazes de liberar hidróxido de cálcio como subproduto da reação após hidratação, induzindo a mineralização, resultando em reparo ósseo. Além disso, o silicato tricálcico tem capacidade de formar fosfato de cálcio (hidroxiapatita) quando em contato com fluido tecidual (29). Os íons reagem com o dióxido de carbono presente nos tecidos, produzindo cristais de calcita, que permite a adesão e diferenciação celular, resultando na formação de tecido mineralizado (30). Em um estudo para avaliar as propriedades físico-químicas do Sealer Plus BC comparada ao AH Plus, este cimento apresentou alta solubilidade, o que pode explicar os altos valores de pH e os resultados deste estudo (6).

6 CONCLUSÃO

A literatura mostra que muitos cimentos biocerâmicos têm o potencial de promover o reparo ósseo quando extravasados através do forame apical durante o preenchimento do canal radicular ou reparos das perfurações radiculares (23). Todos os materiais estudados apresentaram viabilidade celular segundo a ISO 10993-5 (2009) e bioatividade. Os cimentos Sealer Plus BC e MTA Fillapex, à base de silicato, promoveram uma melhor migração celular, comparado aos cimentos à base de resina AH Plus e Sealer Plus que não obtiveram o fechamento da ferida no estudo. O Sealer Plus BC obteve resultados satisfatórios nos ensaios de viabilidade, migração celular e bioatividade.

REFERÊNCIAS

- 1 Koch KA, Brave DG. Bioceramics, part I: the clinician's viewpoint. *Dent Today*. 2012 Jan;31(1):130-5.
- 2 Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):372-5.
- 3 Silvestre AS, Mendonça DL. Aplicações clínicas dos cimentos biocerâmicos em endodontia. 2017;2(1).
- 4 Lima NFF, Santos PRN, Pedrosa MS, Delboni MG. Cimentos biocerâmicos em endodontia: revisão de literatura. *RFO*. 2017 Ago;22(2):248-54.
- 5 Oliveira PMS. Biocerâmicas em Endodontia [dissertação]. Porto (Portugal): Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde; 2014.
- 6 Mendes AT, Silva PB, Só BB, Hashizume LN, Vivan RR, Rosa RA, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of New Calcium Silicate-Based Sealer. *Brazilian Dental Journal*. 2018 Jun;29(6):536-40.
- 7 Jafari F, Jafari S, Etesamnia P. Genotoxicity, Bioactivity and Clinical Properties of Calcium Silicate Based Sealers: A Literature Review. *Iran Endod J*. 2017 Set;12(4):407-13.
- 8 Cintra LTA, Benetti F, Queiroz IOA, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, et al. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy-based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide. *J Endod*. 2017 Dec;43(12):2088-92.
- 9 Hakki SS, Bozkurt BS, Ozcopur B, et al. The response of cementoblasts to calcium phosphate resin-based and calcium silicate-based commercial sealers. *Int Endod J*. 2013 Mar;46(3):242-52.
- 10 Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG, Piazza B, Vasconcelos BC, Alcalde MP, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):501-5.
- 11 Rodriguez-Lozano FJ, Garcia-Bernal D, Onate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicatebased endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *International Endodontic Journal*. 2015;50(1):67-76.
- 12 Silva EJNL, Carvalho NK, Ronconi CT, De-Deus G, Zuolo ML, Zaia AA. Cytotoxicity Profile of Endodontic Sealers Provided by 3D Cell Culture Experimental Model. *Brazilian Dental Journal*. Brasil. 2016 Out-Dez;27(6):652-6.

- 13 Ergun G, Egilmez F, Uctasli MB, Yilmaz S. Effect of light curing type on cytotoxicity of dentin-bonding agents. *Int Endod J.* Âncara, Turquia. 2007 Mar;40(3):216-23.
- 14 Estrela C. *Metodologia Científica*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005.
- 15 Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *International Endodontic Journal*. 2017 Dez;50(2):31–9.
- 16 Li J, Yan M, Wang Z, Jing S, Li Y, Liu G, et al. Effects of Canonical NF- κ B Signaling Pathway on the Proliferation and Odonto/Osteogenic Differentiation of Human Stem Cells from Apical Papilla. *BioMed Research International*. 2014 Abr;(7):01-12
- 17 Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):133-8.
- 18 Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*. 2013 Jul;101(2):121–32.
- 19 Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):971-6.
- 20 Visioli F, Wang Y, Alam GN, Ning Y, Rados PV, Nör JE, et al. Glucose regulated protein 78 (Grp78) confers chemoresistance to tumor endothelial cells under acidic stress. *PLoS One*. 2014 Jun;9(6):1-9.
- 21 Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin Chem*. 1981 Mar;27(3):493-501.
- 22 Hesse L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*. 2002 Jul;99(14):9445-49.
- 23 Haddad AA, Aziz ZAC. Bioceramic - Based Root Canal Sealer: A Review. *International Journal of Biomaterials*. 2016 Abr;4:1-10.
- 24 Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*. 2007 Mar;2(2):329–33.

- 25 Blattes GBF, Mestieri LB, Böttcher DE, Fossati ACM, Montagner F, Grecca FS. Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. *Archives of Oral Biology*. 2017 Jan;73:34–9
- 26 Cuppini M, Zatta KC, Mestieri LB, Grecca FS, Leitune VCB, Guterres SS, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory drug-delivery systems at endodontic reparative material: Synthesis and characterization. *Dent Mater*. 2019 Mar;35(3):457-67.
- 27 Wang Y, Yan M, Wang Z, Wu J, Wang Z, Zheeng Y, et al. Dental pulp stem cells from traumatically exposed pulps exhibited an enhanced osteogenic potential and weakened odontogenic capacity. *Archives of Oral Biology*. 2013 Nov;58(11):1709-17.
- 28 Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibilidade e bioatividade de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio em células pulpares humanas. *J. Appl. Oral Sci*. 2015 Sept-Oct;23(5):467-71.
- 29 Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater*. 2012 Feb;28(5):584-95.
- 30 Araújo LB, Cosme-Silva L, Fernandes AP, Oliveira TH, Cavalcanti BN, Gomes-Filho JE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J. Appl. Oral Sci*. 2018;26:1-8.

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Pesquisa (COMPESQ)

Sistema Pesquisa - Projetos

12/12/18 09:37

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Fabiana Soares Grecca Vilella

Dados Gerais:		Retornar	
Projeto Nº:	34629	Título:	AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E CITOTOXICIDADE DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS SEALER PLUS BC, SEALER PLUS, MTA FILLAPEX E AH PLUS EM CULTURA DE CELULAS E TECIDO CONJUNTIVO DE RATOS
Área de conhecimento:	Endodontia	Início:	01/05/2018
		Previsão de conclusão:	30/04/2020
Situação:	Projeto em Andamento		
Origem:	Faculdade de Odontologia Programa de Pós-Graduação em Odontologia	Projeto da linha de pesquisa: BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS	
Local de Realização:	não informado		
Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.			
Objetivo:			
<p>calcificadas na cápsula adjacente aos implantes, a presença de estruturas positivas ao método (impregnadas em negro) será descrita, levando em consideração a quantidade e localização. Para o estudo in vitro, diferentes concentrações dos extratos dos cimentos endodônticos serão mantidas em contato com meio de cultura por 24 horas e coletadas para o ensaio de viabilidade e biotividade. Células-tronco da papila apical.</p>			
Palavras Chave:			
ENDODONTIA, CITOTOXICIDADE, BIOCOMPATIBILIDADE			
Equipe UFRGS:			
<p>Nome: FABIANA SOARES GRECCA VILELLA Coordenador - Início: 01/05/2018 Previsão de término: 30/04/2020</p> <p>Nome: GABRIELA CARDOSO FERREIRA Outra: Aluno de Mestrado - Início: 01/05/2018 Previsão de término: 30/04/2020</p> <p>Nome: Lucas Siqueira Pinheiro Outra: Aluno de Doutorado - Início: 01/05/2018 Previsão de término: 30/04/2020</p> <p>Nome: PATRICIA MARIA POLI KOPFER MORA Pesquisador - Início: 01/05/2018 Previsão de término: 30/04/2020</p> <p>Nome: ROBERTA KOCHENBORGER SCARPARO Pesquisador - Início: 01/05/2018 Previsão de término: 30/04/2020</p>			
Avaliações:			
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais - Aprovado em 07/05/2018 Clique aqui para visualizar o parecer</p>			

[Carta de aprovação disponível desde 10/12/2018](#)

Comissão de Pesquisa de Odontologia - Aprovado em 19/04/2018 [Clique aqui para visualizar o parecer](#)

Anexos:

[Projeto Completo](#)

Data de Envio: 07/05/2018

[Concordância de Instituição](#)

Data de Envio: 14/03/2018

[Formulário de](#)

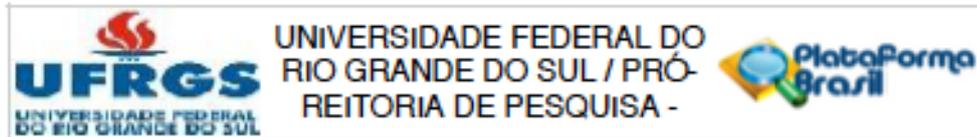
Data de Envio: 21/03/2018

[Encaminhamento do](#)

[Protocolo de Pesquisa com](#)

[Animais](#)

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E BIOATIVIDADE DE CULTURAS PRIMÁRIAS DO ÓRGÃO DENTÁRIO FRENTE A NOVOS MATERIAIS ENDODÔNTICOS

Pesquisador: Fabiana Soares Grecca

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 38542614.6.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

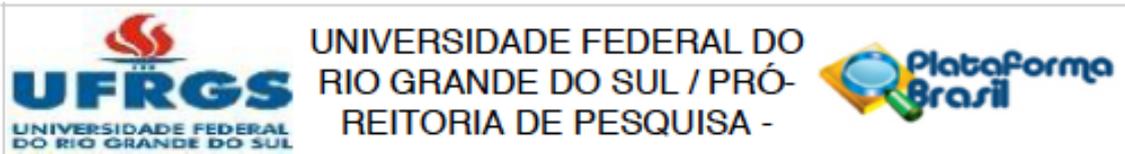
Número do Parecer: 1.112.946

Data da Relatoria: 28/05/2015

Apresentação do Projeto:

Materiais a base de silicato de cálcio vêm sendo considerados materiais de escolha para o tratamento de perfurações, reabsorções, obturação retrógrada, proteção pulpar e, mais recentemente, para obturação do sistema de canais radiculares. Visto isso, novos cimentos a base de silicato de cálcio foram lançados no mercado, como o MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA) e o Biodentine (Septodont, Lancaster, PA, USA). O objetivo deste estudo será isolar e caracterizar células da polpa, do folículo e da papila dentária de terceiros molares humanos extraídos durante a fase de rizogênese incompleta e avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e bioatividade dos novos cimentos endodônticos a base de silicato de cálcio (MTA Plus e Biodentine) nas mesmas, comparando-os com cimentos tradicionalmente utilizados na prática clínica nos casos de obturação do sistema de canais radiculares e retrobturação. Após isolamento, as células das culturas primárias serão avaliadas quanto a presença de características imunofenotípicas e pluripotenciais que possam qualificar a presença de uma subpopulação de células-tronco pelos ensaios citometria de fluxo, PCR Real Time e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Após a obtenção das culturas de células-tronco, os cimentos endodônticos serão divididos em 2 grupos: 1) análise dos cimentos obturadores (cimentos: MTA Plus, Biodentine, AH, Plus, Fillapex e FillCanal); e 2) análise dos cimentos retrobturadores (cimentos: MTA Plus,

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.112.946

Biodentine, MTA Branco, Sealer 26 e FillCanal), ambos utilizando células obtidas da papila dentária humana. Serão realizados ensaios para avaliação da citotoxicidade (MTT), viabilidade (Alamar Blue), genotoxicidade (Cometa), bioatividade (atividade da enzima fosfatase alcalina e coloração com Alizarin Red) expressão de marcadores moleculares associados à osteogênese e odontogênese (PCR Real Time). Todos os resultados obtidos serão analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 5, sendo considerado o nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, bioatividade e expressão gênica de marcadores moleculares para avaliação de novos cimentos endodônticos in vitro em células-tronco obtidas do órgão dentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estão descritos de forma completa e são válidos para a população do estudo nesta nova versão do projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo tem aprovação da Compesq Odontologia, e possui portanto mérito científico. A nova versão do projeto apresenta população elegível para o estudo entre 18 e 22 anos, o que atende questões éticas e metodológicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória já estavam de acordo com a legislação.

Recomendações:

O presente projeto de pesquisa está em condições de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação.

Situação do Parecer:

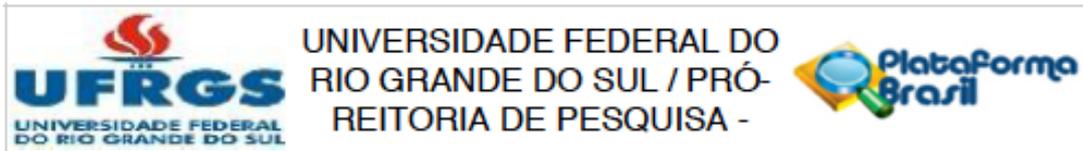
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.



Continuação do Parecer: 1.112.946

PORTO ALEGRE, 18 de Junho de 2015

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

ANEXO C – Autorização do Laboratório de Patologia



Programa de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia

Eu, Roberta Almeida Mendes, vinculada ao Curso de Odontologia sob orientação da profª Drª Fabiana Soares Grecca, solicito a autorização do uso da Sala de Cultura do Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia com a finalidade de conduzir experimentos necessários ao projeto intitulado CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, BIOATIVIDADE E MIGRAÇÃO CELULAR EM CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO.

Porto Alegre, agosto de 2018

Prof. Fernanda Visioli
Assinatura do responsável