

# Avaliação da Toxicidade de Materiais Endodônticos em Células-Tronco da Polpa Dentária

## Toxicity Evaluation of Endodontic Materials in Dental Pulp Stem Cells

Carlos A. S. MIURA<sup>1</sup>, Matheus S. SÁ<sup>2</sup>, Ricardo S. LIMA<sup>3</sup>, Maria A. A. M. Machado<sup>4</sup>, Paloma D. S. TELLES<sup>5</sup>

1 - Pós-graduando (doutorado) em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru da USP, São Paulo;

2 - Pós-graduando (doutorado) do curso de pós-graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa do CPqGM/FIOCRUZ Bahia;

3 - Professor Assistente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, campus Petrolina – Pernambuco;

4 - Professora Titular da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP;

5 - Professora Adjunta da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal da Bahia.

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar ao efeito citotóxico do Hidróxido de Cálcio, *Paramonoclorofenol Canforado*, *Otosporin* e *Formocresol* diluído em células-tronco da polpa de dente permanente humano (DPSC). As DPSC foram semeadas em placa de cultura na concentração de  $1,5 \times 10^4$  células/poço. Foram feitas diluições das drogas em 1:9, 1:27 e 1:81 e deixadas em contato com as células por 2 horas, sendo que o grupo controle foi mantido em DMEM completo. As células foram lavadas com solução

salina duas vezes. Foram realizadas avaliações do metabolismo (MTT). Concluiu-se que o Hidróxido de Cálcio e o *Otosporin* foram as drogas menos tóxicas para as DPSC, enquanto que o *Paramonoclorofenol Canforado* e o *Formocresol* foram letais em todas as concentrações.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células-Tronco, polpa dentária, citotoxicidade, materiais endodônticos.

### INTRODUÇÃO

A cárie dentária ainda é um problema de saúde pública no Brasil. Hoje, a Odontologia vive a era da promoção de saúde, fundamentada na etiopatogenia da doença, no tratamento de acordo com as características da sua manifestação no indivíduo e na prevenção da recorrência. Os avanços no conhecimento sobre a função e organização de células e moléculas serão modificadores da maneira como o cirurgião dentista diagnostica as doenças no sistema estomatognático. Assim como na Medicina, onde os estudos com células-tronco já estão mais avançados, com o tratamento de cardiopatias e doenças neuronais, na Odontologia os experimentos nesta área iniciam o estudo sobre regeneração tecidual, reversão nos quadros de pulpites e neoformação óssea<sup>1-11</sup>.

As células-tronco são geralmente definidas como células clonogênicas capazes de auto-renovação e diferenciação multilinhagem<sup>12</sup>, e podem ser de origem embrionária ou pós-natais<sup>3,13,14</sup>. Essas células têm sido isoladas de uma variedade de tecidos como medula óssea, cérebro, pele, folículos pilosos, musculatura esquelética e polpa dental<sup>5,9</sup>. Estudos recentes têm apontado para o potencial de aplicação das células-tronco na regeneração dentária, terapias pulpares e regeneração óssea<sup>5,7-11,15,16</sup>.

Devido à incidência de lesões de cárie, traumáticas e às injúrias da polpa, o Cirurgião Dentista utiliza terapêuticas com biomateriais para restabelecer a estrutura dental danificada e eliminar os fatores patogênicos. Até a presente data, não existe

nenhum material restaurador dentário que contemple as propriedades físicas e mecânicas ideais para substituir tecidos dentários perdidos por cárie ou traumatismo, e por isso, a busca por novos materiais se faz necessária<sup>17</sup>. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de materiais endodônticos utilizados na clínica em células-tronco da polpa dentária, através do teste do MTT. Para tanto, foram utilizadas células-tronco da polpa de dentes permanentes humanos - DPSC (*Dental Pulp Stem Cells*).

### MATERIAL E MÉTODO

#### *Cultura de células*

As DPSC<sup>2</sup> foram cultivadas em garrafas plásticas de 25, 75 e 150 cm<sup>2</sup> cellstar® (Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse 2 Frickenhausen, Germany), em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose 1X* (DMEM) (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) e 1% de Penicilina 10000 unidades/ml e Estreptomicina 10000µg/ml (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) (meio completo) em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% na temperatura de 37°C ELITE II® (REVCO)<sup>18</sup>. A cultura de células foi realizada com troca do meio a cada dois dias, até atingir a confluência celular. Em seguida, foi realizada a tripsinização, criopreservação e novas culturas das DPSC<sup>19</sup>. A cultura foi realizada até atingir o número necessário de células para a realização do experimento.

### Materiais endodônticos avaliados

Neste estudo foram testados do hidróxido de cálcio P.A. BIOCAL®(Uraby), *Paramonoclorofenol Canforado*® (Biodinâmica), *Formocresol diluído*® (Biodinâmica) e *Otosporin*®(FQM) .

### Plaqueamento das células

Uma calibração prévia do número de células ideal para o experimento foi realizada. O número de células determinado foi  $1,5 \times 10^4$  células por poço. As células foram semeadas nesta concentração em 45 poços numa placa de cultura de 96 poços (CELLSTAR® greiner bio one), e incubadas pelo período de 48 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C ELITE II® (REVCO).

### Diluição e adição das drogas ao meio de cultura

As drogas selecionadas neste experimento foram esterilizadas em irradiador IBL 437 C (CIS bio International), pelo período de 15000 segundos. Como o hidróxido de Cálcio encontrava-se na forma de pó, foi feita a dissolução da droga na proporção de 10mg/ml em solução salina.

Para a realização do teste de citotoxicidade foi realizada uma calibração da diluição das drogas a serem utilizadas no experimento. As diluições selecionadas foram 1:9, 1:27 e 1:81, devido à formação de precipitado das drogas nas diluições de 1:1 e 1:3, que impossibilitou a leitura correta no espectrofotômetro. Elas ficaram em contato com as células pelo período de 2 horas e posteriormente foram lavadas com solução salina estéril (Solução Isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9%, Aster Produtos Médicos LTDA). Os experimentos foram executados em triplicata.

### Método colorimétrico do metiltetrazolium (MTT Assay)

Este teste baseia-se na metabolização do MTT pela mitocôndria de células viáveis, que irá liberar a enzima succinato desidrogenase, capaz de converter o sal do tetrazolium, que é hidrossolúvel e de cor amarelada em cristais de Formazan, de cor azul escura<sup>18</sup>. O plaqueamento foi realizado na concentração de 10% do MTT. Para a realização do teste, foi feita uma

calibração do melhor período de metabolização do MTT pelas DPSC, que foi de 2 horas. A viabilidade celular foi avaliada em espectrofotômetro Espectra Max 190 (Molecular Devices) num comprimento de onda de 570 nm após 2 horas em contato com o MTT. O resultado é uma medida de Densidade Óptica (D.O.). Quanto mais escura for a coloração, maior será a metabolização do MTT, conseqüentemente, maior a D.O., e menos citotóxica é a droga testada. (Fotomicrografia 1)

### Análise estatística

Os dados encontrados foram expressos em média e percentual de toxicidade. Os níveis de significância entre as drogas testadas foram analisados segundo Análise de Variância (ANOVA), pelo Software Graphpad PRISM® 4.0. P valor = 0,0076. Para as comparações múltiplas entre os grupos e o controle, e intragrupos, foi utilizado o teste de Newman-Keuls, com significância de  $p < 0,05$ .

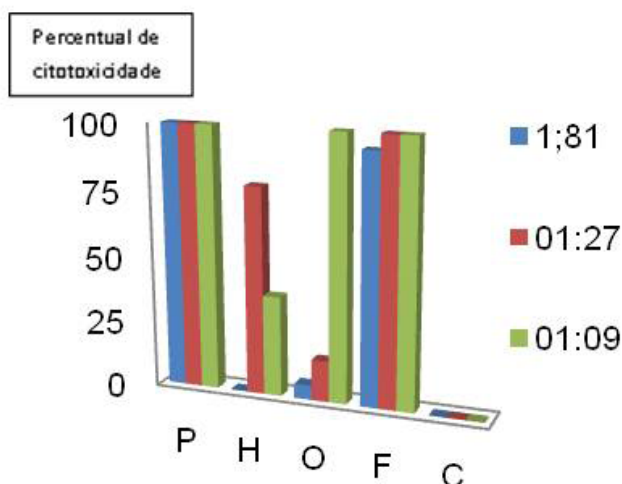
## RESULTADOS

Quando comparados ao grupo controle (DPSC com DMEM completo), o *Paramonoclorofenol Canforado* e o *Formocresol* apresentaram nível de toxicidade de aproximadamente 100% nas três diluições, com  $p < 0,05$ . Após a leitura no espectrofotômetro, o valor de D.O. quando comparado com o controle foi zero. Não houve metabolização do MTT devido à morte de todas as células quando em contato com estas substâncias, independente da concentração. (Gráfico 1)

Analisando-se o *Otosporin*® e o Hidróxido de Cálcio, não houve diferença estatisticamente significativa entre elas, mas o comportamento das células perante estas drogas sugere que o Hidróxido de Cálcio foi a droga menos citotóxica neste estudo, apesar das variações na sua concentração. O *Otosporin*® apresentou baixa toxicidade nas menores concentrações, porém na maior concentração foi 100% letal para as DPSC.

## DISCUSSÃO

Mesmo com a toxicidade comprovada, algumas drogas ainda são utilizadas como padrão ouro na terapia pulpar. Este estudo propôs a utilização das DPSC por se tratarem de células-tronco da polpa dentária, com potencial de diferenciação em células endoteliais e odontoblastos<sup>11</sup>.



**Fotomicrografia 1:** aumento de 40X, ilustrando a metabolização do MTT pelas DPSC e a formação dos cristais de *Formazan*. Quanto mais escura a imagem, maior a formação dos cristais e maior o número de células vivas.



**Gráfico 1.** Comparação do percentual de toxicidade entre *Paramonoclorofenol Canforado* (P), Hidróxido de Cálcio (H), *Otosporin* (O) e *Formocresol* (F) em três diluições e grupo controle (C) sobre as DPSC após o período de 2 horas de incubação do MTT.

Existem poucos estudos que utilizam células da polpa dentária para avaliar toxicidades de agentes químicos, incluindo as medicações endodônticas<sup>20</sup>. Soekanto *et al.*<sup>22</sup> (1996) utilizaram células-tronco da polpa de incisivo de rato para avaliar a toxicidade do *Fenol Canforado* e do *Paraclorofenol Canforado* através do teste de MTT. Apesar de este estudo ter avaliado outras substâncias, foi realizada a análise colorimétrica de sobrevivência celular e sua proliferação *in vitro*.

Nishimura *et al.*<sup>20</sup> (2007) afirmaram que o *Formocresol* gerou aberrações cromossômicas em células-tronco da polpa dentária humana, enquanto isso não foi constatado com o Hidróxido de Cálcio e o *Paramonoclorofenol Canforado*<sup>23,25</sup>. Apesar de alguns estudos na literatura afirmarem sobre os possíveis efeitos tóxicos mutagênicos e carcinogênicos do *Formocresol*, ainda hoje ele continua sendo o padrão ouro para a pulpotomia de dentes decíduos. Já foi comparado com outras drogas utilizadas na pulpotomia de dentes decíduos e numa escala de toxicidade, aparece sempre com maior grau. Os achados neste estudo corroboram com estes autores e apontam para o elevado índice de toxicidade do *Formocresol*<sup>23,25,26</sup>.

Menezes *et al.*<sup>25</sup> (2006) analisaram a toxicidade do *Formocresol* (FC), *Formocresol* diluído (FCD), Solução de Sulfato Férrico (SF), Hidróxido de Cálcio P.A. (HC) e Agregado Trióxido Mineral (MTA) em linhagem de Fibroblastos Balb-c 3T3 através da definição da dose TD50. As diluições das drogas foram feitas nas proporções de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 e numa escala de toxicidade, concluíram que o FC apresentou maior toxicidade, seguido do FCD, SF, HC e MTA. Porém, as diluições utilizadas, apesar de estarem de acordo com as normas da ISO (*International Organization for Standardization*) 10993-12, referente à avaliação biológica de dispositivos médicos, são distantes da realidade clínica, visto que as drogas testadas são utilizadas em íntimo contato com a câmara pulpar dos dentes decíduos na sua maior concentração. As reações tóxicas tendem a ser doses dependentes e diretamente proporcionais à quantidade da substância empregada. No nosso estudo, com o objetivo de adequar este experimento para uma situação mais próxima da realidade clínica, as diluições foram feitas na proporção de 1:9, 1:27 e 1:81.

Nagem Filho *et al.*<sup>27</sup> (2007) afirmaram que o *Paramonoclorofenol Canforado* apresentou potencial irritativo ao tecido cutâneo de ratos, e que a toxicidade desta droga depende da sua concentração. Estes dados corroboram com os resultados do nosso trabalho, pois independente da concentração avaliada, o índice de toxicidade desta droga foi de 100%.

Hidalgo *et al.*<sup>26</sup> (1999) avaliaram a biocompatibilidade de materiais utilizados como curativo de demora em endodontia através da tolerância tecidual. As drogas foram colocadas na forma concentrada em contato direto com a córnea de coelhos. Foi observada resposta inflamatória intensa quando utilizados o *Paramonoclorofenol Canforado* e o *Formocresol* em comparação com o Hidróxido de Cálcio e o *Otosporin*<sup>®</sup>, que apresentaram melhor biocompatibilidade. Estes achados corroboram com os resultados encontrados no nosso estudo. O *Otosporin*<sup>®</sup> apresentou baixo percentual de toxicidade nas duas menores concentrações, porém em sua maior concentração, houve 100% de toxicidade, o

sinaliza a tentativa de minimizar este efeito tóxico sem a perda da eficácia clínica.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir com a realização desse trabalho: Todos os materiais endodônticos avaliados mostraram potencial tóxico às células.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fiocruz – Bahia por disponibilizar a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB /3176).

## REFERÊNCIAS

- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Post natal human dental pulp stem cells (DPSCs) *In vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(25):13625-30.
- Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81(8):531-35.
- Krebsbach PH, Robey PG. Dental and skeletal stem cells: Potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent* 2002;66(6):766-73.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(10):5807-12.
- Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004;83(7):518-22.
- Santos RR, Soares MBP, Carvalho ACC. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37(6):490-95.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Shi S, Wang S. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE* 2006;1(79):1-8.
- Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Rev and Rep* 2010;Published on line.
- Huang GTL, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues *vs.* Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* 2009;88(9):792-806.
- Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental Stem Cell Therapy with Calcium Hydroxide in Dental Pulp Capping 2010;16(6):1823-33.
- Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium *J Dent Res* 2010; 89(8):791-6.
- Cedar SH, Cooke JA, Patel MR, Luo G, Minger SL. The therapeutic potential of human embryonic stem cells. *Indian J Med Res* 2007;125(1):17-24.
- Donadio NF, Donadio N, Celestino CO, Aoki T. Caracterização da inviabilidade evolutiva de embriões visando doações para pesquisas de células-tronco. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005;27(11):665-71.
- Risbud MV, Shapiro IM. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofacial Res* 2005;8(2):54-59.
- Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC.

- Tissue Engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002;81(10):695-700.
16. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res* 2005;15(5):301-16.
  17. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res* 2003;6(3):317-20.
  18. Frederico PG, Lanza CRM, Aranha AMF, Hebling J, Costa CAS. Análise da citotoxicidade do agregado de trióxido mineral (MTA-Branco) em cultura de Odontoblastos. Influência dos tempos de presa e do armazenamento do material em meio líquido. *Rev Odontol Unesp* 2006;35(4):319-26.
  19. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, *et al.* Multipotent Mesenchymal Stem Cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005;80(6):836-42.
  20. Nishimura H, Higo Y, Ohno M, Tsutsui TW, Tsutsui T. Ability of root canal antiseptics used in dental practice to induce chromosome aberrations in human dental pulp cells. *Mutat Res* 2008;649(1-2):45-53.
  21. Soekanto A, Kasugai S, Matakai S, Ohya K, Ogura H. Toxicity of Camphorated Phenol and Camphorated Parachlorophenol in Dental Pulp Cell Culture. *J Endod* 1996; 22(6):284-86.
  22. Waterhouse PJ, Nunn JH, Whitworth JM, Soames JV. Primary molar pulp therapy – histological evaluation of failure. *Int J Paed Dent* 2000;10(4):313-21.
  23. Zarzar PA, Rosenblatt A, Takahashi CS, Takeuchi PL, Costa Júnior LA. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an *in vivo* study. *J Dent* 2003;31(7):479-85.
  24. Patchett CL, Srinivasan V, Waterhouse PJ. Is there life after Buckley's formocresol? Part II – Development of a protocol for the management of extensive caries in the primary molar. *Int J Paediatr Dent* 2006;16(3):199-206.
  25. Menezes JVNB, Granjeiro JM, Bijela MFTB. Análise *in vitro* da toxicidade de substâncias utilizadas em pulpotomias de dentes decíduos. *Rev Ibero-am Odontopediatr Odontol Bebê* 2006;9(47):39-45.
  26. Hidalgo MM, Kawana GRC, Gonçalves CEB, Oliveira RMMW, Bersani-Amado CA. Avaliação da tolerância tecidual a algumas substâncias utilizadas como curativo de demora no tratamento endodôntico. *Rev Fac Odontol Lins* 1999;11(2):5-9.
  27. Nagem Filho H, Nagem HD, Coutinho KQ, Carvalho PRMA, Fiuza CT. Propriedades do Paramonoclorofenol Canforado e Paramonoclorofenol Canforado associado ao Hidróxido de Cálcio. *Pesq Bras Odontoped Integr* 2007;7(3):235-39.

## ABSTRACT

The aim of this paper was analyze the cytotoxicity effect of Calcium Hydroxide, Paramonoclorofenol Canforado, Otosporin and Formocresol deluded in dental pulp stem cells (DPSC). Material and Methods: DPSC were grown in 96 wells culture plate in the concentration of  $1.5 \times 10^4$  cells per well. Dilutions of drugs were as followed: 1:9, 1:27 and 1:81, and control with DPSC in DMEM. The cells were cultured for an additional 2

hours. The cells were washed with bufferin saline solution for 2 times and MTT test was performed. Results: The  $\text{Ca(OH)}_2$  and Otosporin were the drugs less toxic to the DPSC, while the Paramonophenol Canforated and formocresol were lethal in all concentrations. Conclusions: all drugs tested were toxic to the DPSC.

**KEYWORDS:** Stem cells, dental pulp, cytotoxicity, endodontic materials.

## ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Profa. Dra. Paloma Dias da Silva Telles  
 Faculdade de Odontologia – UFBA  
 Rua Araujo Pinho, 62, 6º. andar  
 Departamento de Odontologia Social e Pediátrica  
 Canela - Salvador- Bahia  
 CEP: 40110-150  
 Tel: +55 (71) 3283-8966  
 E-mail: palomatelles@ufba.br