

# BIOESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS EXPOSTAS A SINVASTATINA

## BIOSTIMULATION OF HUMAN PULP CELLS EXPOSED TO SIMVASTATIN

**Maria Luísa de Alencar e Silva LEITE<sup>1</sup>; Gabriela Alves Lima TREVISANO<sup>2</sup>; Ester Alves Ferreira BORDINI<sup>3</sup>; Carla Caroline de Oliveira DUQUE<sup>3</sup>; Uxua Ortecho ZUTA<sup>4</sup>; Josimeri HEBLING<sup>5</sup>; Diana Gabriela SOARES<sup>6</sup>; Carlos Alberto de Souza COSTA<sup>7</sup>**

1 - Mestre em Reabilitação Oral, Departamento de Prótese e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP;

2 - Graduanda em Odontologia, Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP;

3 –Doutoranda em Reabilitação Oral, Departamento de Prótese e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP;

4 - Mestranda em Reabilitação Oral, Departamento de Prótese e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP;

5 - Professora Titular do Departamento de Ortodontia e Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP;

6 - Pesquisadora do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP;

7 - Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

### RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial bioativo da sinvastatina (SV), aplicada por diferentes períodos sobre células da polpa dental humana (HDPCs). Para isto, HDPCs em 80% de confluência (n=6) foram tratadas com meio osteogênico suplementado com 0,01  $\mu\text{M}$  de SV pelos períodos de 24 h, 72 h ou continuamente por até 21 dias. No controle negativo, as células foram mantidas em meio osteogênico. A viabilidade celular (MTT) foi avaliada em períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias, e a deposição de matriz mineralizada (alizarin red) após 14 e 21 dias de cultivo celular. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey ( $\alpha=5\%$ ). Foi observado que nos períodos de 1,

3, 7 e 14 dias não houve diferença significativa na viabilidade das células submetidas aos tratamentos com SV em comparação ao controle ( $p<0,05$ ); no entanto, redução tardia foi observada aos 21 dias para as células tratadas com SV por 72 h ou de modo contínuo ( $p<0,05$ ). Em contrapartida, aumento na deposição de matriz mineralizada foi observado para o tratamento contínuo com SV aos 21 dias, quando comparado ao controle ( $p<0,05$ ). Foi possível concluir que o tratamento contínuo de células pulpares humanas com 0,01 $\mu\text{M}$  de SV foi capaz de bioestimular a deposição de matriz mineralizada *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sinvastatina; Polpa dentária; Dentina.

### INTRODUÇÃO

Uma vez rompida a integridade estrutural da dentina, seja por um processo de cárie ou trauma, a polpa exposta deve ser submetida a uma terapia específica, cujo objetivo principal é restabelecer sua vitalidade e função, desde que a mesma apresente características clínicas e radiográficas que demonstrem sua capacidade de reparo<sup>1</sup>. Por muitos anos, diferentes formulações de hidróxido de cálcio foram amplamente estudadas, sendo este agente considerado padrão-ouro para comparar a resposta de novos materiais dentários desenvolvidos para aplicação direta em polpas expostas<sup>2-4</sup>.

A ação biológica do hidróxido de cálcio na polpa parece estar associada à sua solubilidade e potencial cáustico<sup>5</sup>. Ao ser aplicado diretamente sobre a polpa exposta, este produto causa aumento do pH local, resultando em intensa inflamação e necrose superficial deste tecido conjuntivo especializado<sup>6</sup>. Segundo Graham et al.<sup>7</sup> (2006), a alcalinidade do hidróxido de

cálcio provoca a dissolução do substrato dentinário adjacente à ferida, levando a liberação de moléculas bioativas presas neste tecido mineralizado. Essas moléculas, quando em contato com o tecido pulpar, atuam diretamente na migração de células mesenquimais para a periferia da polpa e na indução de sua diferenciação em células odontoblastóides, capazes de sintetizar e depositar dentina reparadora no local<sup>8</sup>. No entanto, diversos estudos histopatológicos do tecido pulpar exposto submetido ao capeamento com hidróxido de cálcio demonstram que a deposição de dentina reparadora abaixo da área de necrose tecidual é decorrente do potencial regenerativo intrínseco do tecido pulpar adjacente e não exclusivamente pela ação do agente capeador<sup>6</sup>.

Apesar do hidróxido de cálcio ser um produto ainda amplamente utilizado na Odontologia Restauradora, o crescimento dos conhecimentos na área de biologia pulpar, associado a notável evolução no campo da engenharia tecidual e biotecnologia,

tornou imprescindível que o material a ser aplicado sobre a polpa exposta apresente potencial bioativo e citocompatível, estimulando o processo de regeneração do tecido pulpar<sup>9</sup>. Desta forma, o desenvolvimento de biomateriais forradores com potencial para interagir com o complexo dentino-pulpar e atuar positivamente na manutenção da vitalidade da polpa, através da modulação de suas células específicas, tem sido a proposta de inúmeras pesquisas nos últimos anos<sup>1</sup>.

Nesta última década, alguns pesquisadores têm sugerido o uso de substâncias bioativas como potenciais coadjuvantes para o procedimento clínico de capeamento pulpar direto<sup>10,11</sup>. A sinvastatina (SV), droga amplamente empregada no tratamento de hipercolesterolemia, tem emergido como um potente bioestimulador do processo de síntese e mineralização de matriz óssea/dentinária, visto que além de oferecer segurança de uso, também tem custo relativamente baixo<sup>10-17</sup>. Diante desse contexto, o objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar a citocompatibilidade e a bioatividade da sinvastatina em diferentes períodos de tratamento sobre células da polpa dental humana (HDPCs), particularmente quanto ao potencial desta droga de induzir a deposição de matriz mineralizada.

## MATERIAL E MÉTODO

### Cultura celular

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (CAAE: 30939314.5.0000.5416), quatro terceiros molares inclusos ou semi-inclusos recém-extraídos foram obtidos de um voluntário (sexo masculino; 18 anos de idade) atendido na Clínica de Cirurgia da mesma Faculdade. Para participação na pesquisa, o paciente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dentes com cárie, doença periodontal ou alterações endodônticas não foram incluídos no estudo. Após a extração, os dentes foram acondicionados imediatamente em tubos contendo a-MEM (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 100 U/mL penicilina, 100 g/mL estreptomina e 0,25 g/mL fungizone (GIBCO, Grand Island, NY, USA). Em capela de fluxo laminar, o tecido pulpar foi removido com limas endodônticas, sendo este picotado com lâmina de bisturi, e os fragmentos incubados a 37°C por 1 h com 3 mg/mL de colagenase tipo I (Sigma Chemical Co. Sant Louis, MO, EUA) em tampão fosfato (PBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células foram então transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Inc., Corning, NY, EUA) contendo meio de cultura a-MEM (suplementado com 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 2 mmol/L de glutamina; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) com 10% de soro fetal bovino (SFB; GIBCO, Grand Island, NY, USA), e incubados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h. Em seguida, as células aderentes foram cultivadas e subcultivadas em garrafas de cultura celular com meio de cultura a-MEM completo. Células entre a 3ª e 7ª passagens foram empregadas no estudo. A identificação das células tronco na cultura primária de polpa dental foi realizada através de teste de imunofluorescência de acordo com Soares et al.<sup>18</sup> (2017). Assim, a cultura celular utilizada no presente estudo representa uma cultura mista de células pulpares com a presença de uma subpopulação de células mesenquimais indiferenciadas.

### Procedimento experimental

Células HDPCs foram semeadas em placas de 96 compartimentos (Corning Inc., Corning, NY, EUA) em a-MEM com 10% de SFB, na densidade de 5.000 células/compartimento durante 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram submetidas a diferentes tratamentos, de acordo com os grupos experimentais demonstrados na Tabela 1. Desta maneira, as células foram incubadas em meio osteogênico (a-MEM com 10% SFB, suplementado com β-glicerofosfato e ácido ascórbico; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA), suplementado ou não com 0,01 µM de SV (Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA), por períodos de até 21 dias. Nos grupos tratados com SV por 24 ou 72 horas, decorrido este período de incubação com SV, as células foram cultivadas em meio osteogênico sem adição da droga. Nos grupos com tratamento contínuo de SV, as células foram cultivadas em meio osteogênico com adição da droga durante todo o período experimental (meio foi renovado a cada 48 h). O grupo controle negativo foi mantido em meio osteogênico sem adição da droga.

**Tabela 1** - Grupos experimentais de acordo com o período de tratamento com sinvastatina (SV)

Grupos	Período de tratamento com SV
Controle	-
SV24h	24 h
SV72h	72 h
SVCont	Contínuo

### Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT (n=6) após 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Em cada período de análise, as células foram incubadas por 4h em meio de cultura suplementado com 10% da solução de MTT (5 mg/ml; Sigma-Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA). Após este período, os cristais de formazan produzidos foram dissolvidos em isopropanol acidificado (Quemis, Indaiatuba, SP, Brasil) e a solução resultante analisada em leitor de absorvância a 570 nm (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT, USA). O valor médio de absorvância do grupo controle negativo no período de 1 dia foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo os valores em porcentagem dos demais grupos experimentais calculados a partir deste parâmetro<sup>19</sup>.

### Avaliação da deposição de matriz mineralizada

A deposição de matriz mineralizada foi avaliada pelo teste de Alizarin Red (n=6) aos 14 e 21 dias. A cada período de análise, as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C por 1 h e incubadas com solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4,2; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA). Após este período, as células foram lavadas com água deionizada, e a formação dos nódulos foi avaliada por microscópio de luz (Olympus BX51TF, Tóquio, Japão). Imagens da formação de nódulos de mineralização foram obtidas em um aumento de 4x. Em seguida, foi aplicada a solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7,0; Sigma Chemical Co., Sant Louis, MO, EUA) para dissolução dos nódulos, sendo a absorvância da solução resultante avaliada a 560 nm (Synergy H1, Biotek). Para esta análise, o grupo controle aos 14 dias foi

considerado como 100% de marcação, sendo os valores em porcentagem dos demais grupos experimentais calculados a partir deste parâmetro<sup>18</sup>.

### Análise estatística

Os experimentos foram realizados em duplicata a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados observados. Diante na normalidade dos dados, estes foram submetidos ao teste ANOVA two-way, seguido pelo teste de Tukey para avaliação da diferença estatística entre os grupos experimentais. Todos os testes foram fixados a um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

### Viabilidade celular

Tal como observado na Figura 1, aumento significativo da viabilidade celular ocorreu para todos os grupos experimentais ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ). Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos até o período de análise de 14 dias ( $p > 0,05$ ), redução tardia da viabilidade celular foi observada para os grupos tratados por 72 h ou continuamente com SV 0,01  $\mu\text{M}$  em relação ao grupo controle aos 21 dias ( $p < 0,05$ ).

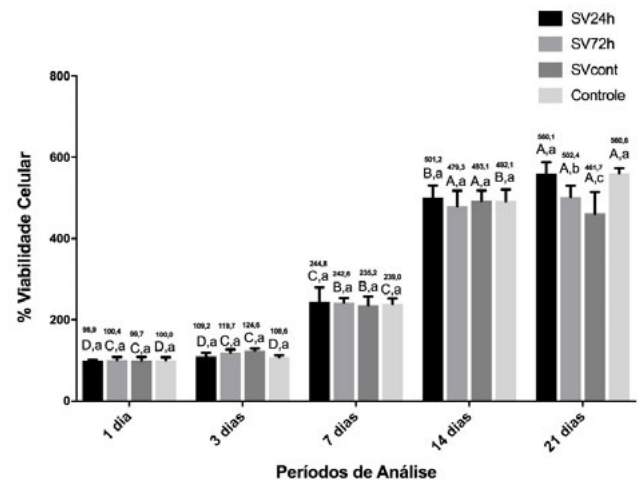
### Deposição de matriz mineralizada

De acordo com a Figura 2, no período de análise de 14 dias não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ); porém, aumento significativo da deposição de matriz mineralizada foi observado para o grupo tratado continuamente com 0,01  $\mu\text{M}$  de SV em relação ao grupo controle após 21 dias em cultura ( $p < 0,05$ ). Imagens da formação de nódulos de mineralização no período de análise de 21 dias estão demonstradas na Figura 3.

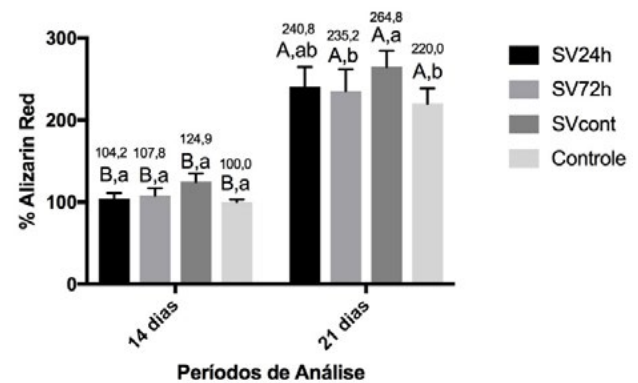
## DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado que o contato direto da SV sobre células mesenquimais indiferenciadas (MSCs) da polpa acelera a diferenciação odontogênica, sendo observada a formação de matriz mineralizada *in vitro*<sup>10,11,13,20-22</sup> e *in vivo*<sup>14,17</sup>. Estudos *in vitro* também demonstraram que a diferenciação odontogênica é mais pronunciada quando baixas concentrações de SV (0,01 a 0,1  $\mu\text{M}$ ) são empregadas, enquanto que elevadas concentrações (1 a 10  $\mu\text{M}$ ) causam efeitos citotóxicos<sup>10,11,13,23</sup>. No entanto, estes autores avaliaram apenas o tratamento contínuo das células com a SV. Desde que a SV deve ser incorporada a biomateriais que promovam sua liberação no sítio de aplicação para então modular a regeneração da dentina mediado por células residentes, é importante verificar se esta droga apresenta efeito tardio nas células pulpares após curtos períodos de tratamento. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do pré-tratamento ou do tratamento contínuo com SV a 0,01  $\mu\text{M}$  sobre a viabilidade e capacidade de deposição de matriz mineralizada por células da polpa dental humana.

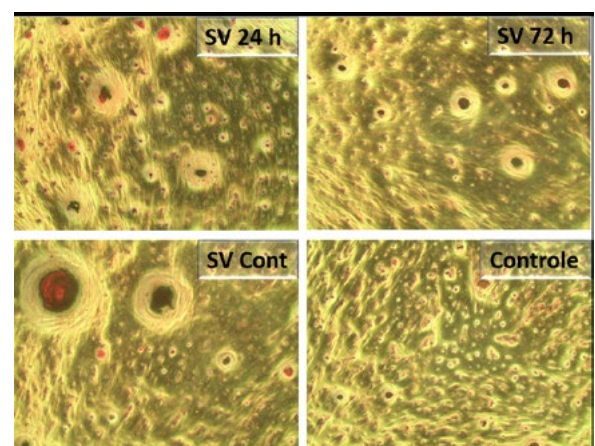
De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi observado que o tratamento com SV não causou efeito citopático nos períodos de análise 1, 3, 7 e 14 dias; porém, redução da viabilidade celular foi observada para os grupos tratados por 72 h ou de modo contínuo com SV em relação ao grupo controle após 21 dias em cultura. Okamoto et al.<sup>10</sup> (2009) e Jia et al.<sup>17</sup>



**Figura 1** - Média e desvio padrão dos valores da viabilidade celular (%) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; ANOVA a dois critérios e teste de Tukey;  $p < 0,05$ ). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise. Números representam valores médios (%) de viabilidade celular.



**Figura 2** - Média e desvio padrão dos valores da deposição de matriz mineralizada (% Alizarin Red) dos grupos experimentais nos períodos de análise (n=6; ANOVA a dois critérios e teste de Tukey;  $p < 0,05$ ). Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo experimental. Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise. Números representam valores médios (%) de marcação positiva para alizarin red.



**Figura 3** - Imagens obtidas em microscopia de luz invertida (4x) representativas do ensaio de alizarin red. Observa-se que o tratamento contínuo com 0,01  $\mu\text{M}$  de SV apresentou nódulos de mineralização maiores (em vermelho) que aqueles observados nos demais grupos experimentais.

(2016) observaram redução da viabilidade de células tronco da polpa dental humana (hDPSCs) após 5 dias de tratamento contínuo com 1  $\mu\text{M}$  SV comparado ao grupo controle negativo; em contrapartida, os autores demonstraram aumento na expressão de marcadores específicos do processo de síntese e deposição de matriz mineralizada sob estas mesmas condições. Resultado similar foi observado no presente estudo, desde que os maiores valores de deposição de nódulos de mineralização foram observados para os grupos tratados continuamente com 0,01  $\mu\text{M}$  de SV. Desse modo, parece que a bioatividade sobre as células pulpares possa estar relacionada com uma redução na capacidade proliferativa em períodos tardios. Isto pode ser confirmado por estudos anteriores<sup>24,25</sup>, onde é observado que células em processo de diferenciação apresentam redução na sua proliferação.

Quanto à deposição de matriz mineralizada, foi observado que após 21 dias esta atividade celular estava aumentada apenas para o grupo tratado continuamente com 0,01  $\mu\text{M}$  de SV comparado ao grupo controle negativo. Okamoto et al.<sup>10</sup> (2009) relataram aumento na deposição de matriz mineralizada quando hDPSCs foram tratadas continuamente com 0,1  $\mu\text{M}$  de SV por 7 dias e então transplantadas para o tecido subcutâneo de ratos imunocomprometidos. Min et al.<sup>11</sup> (2010) e Lee et al.<sup>20</sup> (2012) também demonstraram aumento na formação de matriz mineralizada quando hDPSCs foram tratadas continuamente por 14 dias com 0,1  $\mu\text{M}$  de sinvastatina. O mecanismo de ação envolvido na indução de síntese e deposição da matriz mineralizada na presença de SV parece estar relacionado, ao menos em parte, à ativação da via de sinalização MAPK/ERK, a qual está intimamente ligada ao processo de diferenciação osteo/odontogênica<sup>13,26,27</sup>.

Apesar de Asl Aminabadi et al.<sup>14</sup> (2013) observarem que concentrações de 1 a 5  $\mu\text{M}$  de SV associadas a uma pasta de carboximetilcelulose de sódio (material inerte) estimulam a formação de barreira mineralizada no tecido pulpar de dentes decíduos; menores concentrações de SV induziram maior deposição de matriz dentinária e causaram menor reação inflamatória na região da ferida pulpar. Jia et al.<sup>17</sup> (2016) também demonstraram aumento da mineralização *in vivo* quando a SV (1  $\mu\text{M}$ ) foi aplicada em dentes de cães submetidos à pulpotomia; entretanto, esta concentração suprimiu a proliferação de células pulpares humanas *in vitro*.

Desta maneira, baseado nos resultados do presente estudo, bem como de pesquisas anteriores, é possível sugerir que baixas concentrações de SV além de seguras e citocompatíveis, também são capazes de bioestimar células pulpares humanas contendo uma subpopulação de células MSCs no processo de formação de matriz mineralizada. Porém, é necessária a presença de baixas dosagens desta droga, por longos períodos de tempo para promover o aumento na deposição de matriz mineralizada, uma vez que foi constatado no presente estudo que o pré-tratamento das HDPCs com 0,01  $\mu\text{M}$  de SV não apresentou efeito bioativo.

A liberação contínua de baixas dosagens de SV a partir de biomateriais que funcionem como uma matriz extracelular temporária parece ser uma alternativa interessante para a engenharia tecidual aplicada a regeneração do complexo dentino-pulpar. Pesquisas recentes demonstraram resultados animadores para a modulação da regeneração do tecido ósseo por células tronco da medula óssea, a partir de scaffolds com liberação controlada de

baixas dosagens de SV<sup>28,29</sup>. Desta forma, o emprego da SV apresenta-se como uma alternativa promissora em substituição ao tratamento convencional do tecido pulpar exposto, permitindo que as MSCs da polpa dental migrem para o interior do biomaterial e se diferenciem em células odontoblastóides, as quais são responsáveis pela síntese, deposição e mineralização de matriz dentinária rica em colágeno. Dentro dessa proposta, espera-se que ocorra uma liberação controlada de concentrações bioativas e citocompatíveis de SV, auxiliando na proteção e restabelecimento da normalidade estrutural e homeostasia do complexo dentino-pulpar.

## CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada neste estudo *in vitro*, foi possível concluir que, o tratamento contínuo com sinvastatina a 0,01  $\mu\text{M}$  apresenta potencial bioativo e citocompatível sobre células pulpares humanas em cultura, particularmente estimulando a deposição de matriz mineralizada.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (MS: 2015/15635-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Auxílio: 03599/2014 e 443153/2014-0) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010; 98(1): 2-14.
2. Souza Costa CA, Nascimento AB, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater*. 2002; 18(7): 543-51.
3. Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater*. 2006; 22(10): 954-62.
4. Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 81(1): 175-84.
5. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J*. 2013; 46(1): 3-19.
6. Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater*. 2014; 30(7): 769-84.
7. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006; 27(14): 2865-73.
8. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Adv Dent Res*. 2011; 23(3): 340-5.
9. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012; 28(1): 23-40.
10. Okamoto Y, Sonoyama W, Ono M, Akiyama K, Fujisawa T, Oshima M, et al. Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*. *J Endod*. 2009; 35(3): 367-72.

11. Min KS, Lee YM, Hong SO, Kim EC. Simvastatin promotes odontoblastic differentiation and expression of angiogenic factors via heme oxygenase-1 in primary cultured human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36(3): 447-52.
12. Pullisaar H, Tiainen H, Landin MA, Lyngstadaas SP, Haugen HJ, Reseland JE, et al. Enhanced in vitro osteoblast differentiation on TiO<sub>2</sub> scaffold coated with alginate hydrogel containing simvastatin. *J Tissue Eng.* 2013; 26(4): 1-12.
13. Karanxha L, Park SJ, Son WJ, Nör JE, Min KS. Combined effects of simvastatin and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39(1): 76-82.
14. Asl Aminabadi N, Maljaei E, Erfanparast L, Ala Aghbali A, Hamishehkar H, Najafpour E. Simvastatin versus calcium hydroxide direct pulp capping of human primary molars: a randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2013; 7(1): 8-14.
15. Pullisaar H, Reseland JE, Haugen HJ, Brinchmann JE, Ostrup E. Simvastatin coating of TiO<sub>2</sub> scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 447(1): 139-44.
16. Huang X, Huang Z, Li W. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. *Mol Med Rep.* 2014; 9(6): 2152-8.
17. Jia W, Zhao Y, Yang J, Wang W, Wang X, Ling L, et al. Simvastatin promotes dental pulp stem cell-induced coronal pulp regeneration in pulpotomized teeth. *J Endod.* 2016; 42(7): 1049-54.
18. Soares DG, Rosseto HL, Scheffel DS, Basso FG, Huck C, Hebling J, et al. Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold. *Clin Oral Investig.* 2017.
19. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(5): 1013-20.
20. Lee SY, Min KS, Choi GW, Park JH, Park SH, Lee SI, et al. Effects of simvastatin and enamel matrix derivative on Portland cement with bismuth oxide induced growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2012; 38(3): 405-10.
21. Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with  $\alpha$ -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39(6): 806-12.
22. Miyazawa A, Matsuno T, Asano K, Tabata Y, Satoh T. Controlled release of simvastatin from biodegradable hydrogels promotes odontoblastic differentiation. *Dent Mater J.* 2015; 34(4): 466-74.
23. Saewong S, Thammasitboon K, Wattanaroonwong N. Simvastatin induces apoptosis and disruption of the actin cytoskeleton in human dental pulp cells and periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(8): 964-74.
24. Kupcsik L, Meurya T, Flury M, Stoddart M, Alini M. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(11): 4465-73.
25. Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci.* 2005; 20(3): 438-44.
26. Chen PY, Sun JS, Tsuang YH, Chen MH, Weng PW, Lin FH. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res.* 2010; 30(3): 191-9.
27. Kim IS, Jeong BC, Kim OS, Kim YJ, Lee SE, Lee KN, et al. Lactone form 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) stimulate the osteoblastic differentiation of mouse periodontal ligament cells via the ERK pathway. *J Periodontol Res.* 2011; 46(2): 204-13.
28. Liu YS, Ou ME, Liu H, Gu M, Lv LW, Fan C, et al. The effect of simvastatin on chemotactic capability of SDF-1 $\alpha$  and the promotion of bone regeneration. *Biomaterials.* 2014; 35 (15): 4489-98.
29. Gentile P, Nandagiri VK, Daly J, Chiono V, Mattu C, Tonda-Turo C, et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 59(1): 249-57.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the bioactive potential of simvastatin (SV), applied during different periods on human dental pulp cells (HDPCs). For this, HDPCs at 80% confluency (n = 6) were treated with osteogenic medium supplemented with 0.01  $\mu$ M SV for periods of 24 h, 72 h or continuously up to 21 days. In the negative control group, the cells were cultivated in osteogenic medium. The cell viability (MTT) was evaluated after 1, 3, 7, 14 and 21 days, and the mineralized matrix deposition (alizarin red) was assessed at 14 and 21 days of cell culture. Data were submitted to ANOVA and Tukey's test ( $\alpha=5\%$ ). No

significant difference in cell viability was observed at 1, 3, 7 and 14 days for the cells exposed to SV compared to negative control ( $p<0.05$ ); however, significant reduction was observed at 21 days for cells treated with SV during 72 h or continuously ( $p<0.05$ ). On the other hand, increase in mineralized matrix deposition at 21 days was observed for cells treated continuously with SV when compared to control ( $p<0.05$ ). It was possible to conclude that the continuous treatment of human pulp cells with 0.01  $\mu$ M of SV was able to biostimulate mineralized matrix deposition in vitro.

**KEYWORDS:** Simvastatin; Dental pulp; Dentin

## AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa  
Endereço: Rua Humaitá, 1680, Centro, Araraquara, SP,  
14801-903, Brasil.  
E-mail: casouzac@foar.unesp.br  
Telefone: +55(16) 3301-6477