BRUNO DAS NEVES CAVALCANTI

**RESPOSTA DE FIBROBLASTOS DE POLPA HUMANOS
SUBMETIDOS A SUBSTÂNCIAS LIBERADAS POR
CAPEADORES PULPARES DIRETOS**

São Paulo

2003

BRUNO DAS NEVES CAVALCANTI

**Resposta de fibroblastos de polpa humanos submetidos a
substâncias liberadas por capeadores pulpares diretos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, para obter o Título de
Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2003

Cavalcanti, BN. Resposta de fibroblastos de polpa humanos frente a substâncias liberadas por capeadores pulpares diretos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

São Paulo, 04/02/2004

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Dinarte** e **Neide**, por terem me dado a vida, amor, carinho e todo o apoio, desde a infância, para que eu sempre caminhasse para ser algo mais na vida.*

*Ao meu irmão **Samuel**, por ser um amigo com o qual sempre poderei contar, principalmente nos momentos de diversão, mas sem esquecer os momentos de dificuldades.*

*À **Márcia Sampaio Campos**, por ter acompanhado e apoiado toda a minha carreira acadêmica como companheira e participante em meus trabalhos.*

*À toda minha **família**, pela participação em minha criação e formação.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, particularmente ao Departamento de Dentística, seus professores e funcionários, pelo acolhimento dado nesta etapa.

Ao Prof. Dr. Sigmar de Mello Rode, co-orientador deste trabalho e um dos melhores amigos com o qual se contar, que investiu e continua investindo em mim seja como chefe, seja como orientador em minha carreira.

Ao Prof. Dr. Paulo Isaías Seraidarian, que além de acreditar em mim, ainda aluno de graduação, para iniciar-me na carreira acadêmica, é também um grande amigo em horas de trabalho e descontração.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, pela orientação dada e ensinamentos passados neste curso, cuja atenção jamais será esquecida.

Aos cirurgiões dentistas Cledson de Lima Azevedo e Felipe Torquato Salles, pelo auxílio dado neste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, que neste estágio já são amigos de pós-graduação, pelo compartilhamento de experiências, e pelo amparo dado nas horas difíceis, principalmente pelo fato de serem todos endodontistas.

Aos inimigos, nem tantos nem tão grandes espero, que surgiram no caminho desde o mestrado, mas só fizeram as conquistas serem mais saborosas e valiosas.

A Deus, pela vida e dons a mim dados, que possibilitaram a ultrapassagem de mais esta etapa.

Cavalcanti, BN. Resposta de fibroblastos de polpa humanos frente a substâncias liberadas por capeadores pulpaes diretos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar os efeitos citotóxicos de substâncias liberadas durante a aplicação de materiais utilizados em capeamento pulpar direto, sobre fibroblastos de polpa dentária humana. Utilizou-se para o experimento meios condicionados pelas substâncias a serem testadas, divididas nos grupos a seguir: grupo I: controle (meio de cultivo sem condicionamento); grupo II: cimento de hidróxido de cálcio; grupo III: adesivo dentinário; grupo IV: ácido ortofosfórico a 37%. O condicionamento foi realizado, colocando-se meio de cultivo fresco sobre os materiais de modo que a presa (grupo II), polimerização (grupo III) ou o contato direto (grupo IV) liberassem substâncias para esse meio de cultivo. Esse meio era colocado sobre as células durante todo o experimento, excetuando-se o grupo IV, onde o contato foi feito por um período de 15 segundos, conforme recomendações clínicas. Posteriormente foram realizadas contagens em hemocitômetro pelo método de exclusão por azul de Trypan, que cora somente as células mortas. As contagens foram realizadas em períodos de 0, 6, 12 e 24 horas para o experimento de viabilidade celular (curto prazo), onde se avaliou o percentual de células vivas sobre o total de células, e em períodos de 1, 3, 5 e 7 dias para o experimento de sobrevivência celular, no qual se avaliou o número absoluto de células vivas. Observou-se que as substâncias liberadas pelo adesivo dentinário são citotóxicas em qualquer período, diminuindo consideravelmente a viabilidade celular e afetando suas curvas de crescimento. Aquelas liberadas pelo ácido ortofosfórico a 37%

provocam diminuição da viabilidade somente nos primeiros momentos do contato com as células, enquanto as substâncias liberadas durante a presa do hidróxido de cálcio não são citotóxicas em nenhum momento.

Palavras-Chave: Polpa dentária – Capeamento da polpa dentária – Fibroblasto pulpar – Hidróxido de cálcio – Adesivos dentinários

Cavalcanti, BN. Human pulp fibroblasts response to substances leached from direct pulp capping materials [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate the cytotoxic effects of substances leached during the use of direct pulp capping materials, on human pulp fibroblasts. There were used cell culture mediums conditioned by the test materials, as follows: group I: control (fresh medium without conditioning); group II: calcium hydroxide cement; group III: bonding system; group IV: 37% orthophosphoric acid. The medium conditioning was made, pouring the fresh conditioning medium on the materials, in order that its setting (group II), polymerization (group III) or the direct contact (group IV) would be able to leach substances to this culture medium. These conditioned mediums were put on the cells for the entire experiment, excepting the group IV, in which the mediums were put in contact with the cells for 15 seconds, following clinical recommendations. Cell counting was performed in hemocytometer, using the Trypan blue exclusion method, which mark only the dead cells. These counting was made at experimental times of 0, 6, 12 and 24 hours for the cell viability assay (short term), where it is evaluated the percentage of live cells on the total number of cells, and at experimental times of 1, 3, 5 and 7 days for the survival assay, in which is evaluated the absolute number of live cells. It was observed that the substances leached by the bonding system are cytotoxic at all experimental times, decreasing significantly the cell viability and affecting its growing rate. Those leached by the 37% orthophosphoric acid decreased the cell viability only at the first contact with the cells,

and the substances leached during the setting of the calcium hydroxide cement are not cytotoxic.

Keywords: Dental pulp – Dental pulp capping – Pulp fibroblast – Calcium hydroxide – Dentin bonding system

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Curvas de viabilidade (% de células viáveis x tempo).30

Figura 5.2 - Curvas de crescimento (número de células viáveis x tempo).33

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 -	Análise de variância para o ensaio de viabilidade celular.....	31
Tabela 5.2 -	Médias de viabilidade (%) e erros padrões das médias, de acordo com as interações (tempo x material) e identificação das diferenças* de acordo com o valor crítico de Tukey.....	32
Tabela 5.3 -	Médias de células viáveis ($\times 10^3$) e erros padrões das médias, de acordo com as interações tempo x material.....	33
Tabela 5.4 -	Análise de variância para o ensaio de curva de crescimento.....	34
Tabela Ap. A1 -	Dados originais do experimento de viabilidade celular (%).....	50
Tabela Ap. A2 -	Dados originais do experimento de curva de crescimento (número de células $\times 10^3$)	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH	potencial hidrogeniônico
MTA	do inglês <i>mineral trioxide aggregate</i> – agregado de trióxidos minerais
BMP	do inglês <i>bone morphogenetic protein</i> – proteína morfogenética do osso
EDTA	do inglês <i>ethylenediaminetetracetic acid</i> – ácido etilenodiaminotetracético
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> – meio de Eagle modificado por Dulbecco
ASTM	do inglês <i>American Society for Testing and Materials</i> – Sociedade Americana para Testes e Materiais
PBS	do inglês <i>phosphate buffer saline</i> – solução tampão fosfato-salina
H ₃ PO ₄	ácido ortofosfórico
BIS-GMA	bisfenol-A-glicidil metacrilato
HEMA	2-hidroximetilmetacrilato

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Definição dos grupos experimentais	24
4.2 Preparo das substâncias	25
4.3 Condicionamento dos meios de cultivo	25
4.4 Cultivo celular	26
4.5 Ensaios de viabilidade e sobrevivência celular	26
4.6 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Ensaio de viabilidade celular	30
5.2 Curva de crescimento	32
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	49
ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO

A resposta de tecidos duros em Odontologia, particularmente a da dentina, que fica a cargo da polpa, constitui-se há muito num desafio para os profissionais clínicos e pesquisadores. Isto ocorre porque, mesmo com a grande quantidade de materiais no arsenal do cirurgião dentista, nem sempre esses conseguem promover satisfatoriamente a reparação dos tecidos duros (ou pelo menos selar soluções de continuidade em sua estrutura) evitando alterações dos tecidos moles por fatores inflamatórios e/ou bacterianos.

Dentro desta visão, as exposições pulpares, pelas características peculiares da polpa quanto à constituição, confinamento, irrigação sangüínea e linfática e mesmo capacidade de reação (COHEN; BURNS, 1994), dificultam a seleção do material capeador. Mesmo assim, há tempos o hidróxido de cálcio vem sendo utilizado como material de eleição para a realização de capeamento pulpar direto por possuir propriedades indutoras de mineralização, baixa citotoxicidade, e principalmente alcalinidade que é uma propriedade responsável por inibir crescimento bacteriano e por restaurar o pH do meio geralmente ácido pela produção de ácidos bacterianos (COX; SUZUKI, 1994; KITASAKO et al., 2000; SCHUURS; GRUYTHUYSEN; WESSELINK, 2000). Além disso, o hidróxido de cálcio possui baixo custo, o que permite seu acesso em diferentes níveis, inclusive o de saúde pública. Por outro lado, essa substância possui uma desvantagem

biomecânica, que é a baixa resistência, além de ser altamente solúvel, o que leva à degradação de sua interface no decorrer de alguns anos após a aplicação (COX; SUZUKI, 1994).

Outras alternativas foram propostas para o capeamento direto, como o uso de cimentos de ionômero de vidro, cimentos de óxido de zinco e eugenol, etc. Mais recentemente tem sido proposto o uso da hibridização, ou seja, a aplicação de adesivos dentinários permeados em uma matriz orgânica colágena (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982). A hibridização promove um dos melhores selamentos dentre os materiais usados para o capeamento direto, evitando posterior contaminação bacteriana e permitindo a reparação tecidual (BRANNSTROM; VOJINOVIC, 1976; COX; SUZUKI; SUZUKI, 1995; COX et al., 1999). No entanto, outros trabalhos na literatura vêm apresentando resultados desfavoráveis desse tipo de capeamento no que diz respeito à biocompatibilidade dos adesivos (HEBLING; GIRO; COSTA, 1999a; SOUZA COSTA et al., 2000; STANLEY; GOING; CHAUNCEY, 1975; TROPE et al., 2002), particularmente quando há a possibilidade de liberação de substâncias nocivas no caso de não haver polimerização total dos monômeros resinosos (MANTELLINI et al., 2003; STANISLAWSKI et al, 2003). Esta discordância de análises e resultados tem gerado polêmica sobre a real capacidade dos adesivos dentinários em promover reparação tecidual, criando dúvidas sobre a real capacidade citotóxica destes sistemas.

Diante dessa polêmica sobre a citotoxicidade de materiais utilizados no tratamento da polpa exposta, houve interesse em avaliar o potencial citotóxico de substâncias liberadas por esses materiais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A preocupação com a vitalidade pulpar frente a procedimentos restauradores há muito é foco de pesquisas odontológicas. Particularmente na década de 70, com a introdução das resinas compostas para a restauração de cavidades, começou-se a observar o quanto o material colocado sobre o complexo dentino-pulpar poderia interferir no resultado do tratamento.

Stanley, Going e Chauncey (1975) verificaram que com espessuras de dentina menores que 1,0 mm, as resinas compostas testadas provocavam respostas inflamatórias pulpares mais intensas que o cimento de óxido de zinco e eugenol, principalmente quando as cavidades eram condicionadas com ácido. Da mesma forma, avaliando resinas compostas, Brännström e Vojinovic (1976) observaram também a presença ou não de bactérias na interface dente-restauração e concluíram que mais importante que o material restaurador é a sua capacidade de selamento, fato que impediria a penetração de bactérias e conseqüentemente a geração de processos inflamatórios severos. Mais recentemente, esta informação foi confirmada por Cox et al. (1996).

Frente à polêmica inicial provocada pelo advento das resinas compostas, surgiu na década de 80, mais um fator de discussão entre os pesquisadores da área de proteção pulpar: a hibridização. Divulgada por Nakabayashi, Kojima e Masuhara (1982), a técnica consiste na penetração de um adesivo em dentina

desmineralizada, formando o que os autores chamavam de camada híbrida, na qual o colágeno dentinário e os sistemas adesivos manteriam contato íntimo, melhorando o selamento da cavidade e a resistência adesiva da restauração. No entanto, o fato de necessitar da desmineralização pelo uso de um condicionador ácido, levou ao início da discussão sobre a agressividade desta técnica, que vem desde o final da década de 80 até os dias de hoje.

Os estudos de Akimoto et al. (1998), Cox et al. (1998), Kitasako et al. (2002) e Tarim et al. (1998) afirmaram que o uso de adesivos é biocompatível e provoca respostas semelhantes às do hidróxido de cálcio, só que produzindo ponte de dentina de melhor qualidade estrutural. Sem comparar com o hidróxido de cálcio, mas verificando as respostas pulpares em macacos, Fujitani et al. (2002) também afirmaram a biocompatibilidade de sistemas adesivos.

Além da discussão da necessidade de se aplicar um condicionador ácido em dentina, muitos estudos passaram a avaliar não só a agressão e/ou reparação induzida pelo material restaurador, mas também aquela provocada pela base colocada sob este material (resina ou amálgama). Nesta mesma linha, o hidróxido de cálcio passou a ser o foco das atenções, uma vez que passou-se a discutir se a aplicação de uma base de hidróxido de cálcio poderia ser mais prejudicial que benéfica ao tratamento, como descrito por Murray et al. (2002a), cujos resultados indicaram a menor capacidade de selamento e maior infiltração bacteriana do hidróxido de cálcio. Cox e Suzuki (1994), descreveram as vantagens e desvantagens de se usar este material, frente aos benefícios provocados pela hibridização. Dentre as vantagens, destacaram a alta alcalinidade, propriedade responsável pela capacidade bactericida, bacteriostática, neutralizadora de ácidos bacterianos e indutora de reparação. Como desvantagens, citaram que o hidróxido de cálcio não é

o único estimulador da dentinogênese e formação de ponte dentinária em polpas expostas, além de ser deficiente biomecanicamente e solúvel aos fluidos oral e dentinário, fato que poderia comprometer a resistência da restauração final.

Cox, Suzuki e Suzuki (1995) reafirmaram a biocompatibilidade de adesivos dentinários, informando que poderiam ser utilizados sem o auxílio de uma base de hidróxido de cálcio. Adicionalmente, Cox et al. (1999) advertiram que além de se usar o hidróxido de cálcio de forma conservadora, deve-se observar o uso de adesivos dentinários hidrofílicos (que permitiriam melhor selamento marginal) e o controle da hemorragia no caso de exposição pulpar.

Com o advento de novos materiais, como o agregado de trióxidos minerais (MTA), passou-se também a questionar a eficiência do hidróxido de cálcio, uma vez que Aiehnechi et al. (2002), Dominguez et al. (2002), Faraco e Holland (2001) , Holland et al. (2001) e Pitt Ford et al. (1996), comparando esses dois materiais, observaram que com o MTA, a inflamação pulpar era menos prevalente e que havia a produção de uma ponte de dentina tubular e contínua com a dentina original. Ao contrário, o hidróxido de cálcio pouco induziu a formação de ponte dentinária e a inflamação foi persistente.

Seguindo a linha de tratamento da polpa exposta, as controvérsias são ainda maiores, uma vez que não mais está se aplicando um material sobre um tecido mineralizado que serve como barreira, e sim sobre meio interno do organismo, com células responsáveis pela inflamação e pela reparação da área afetada. Schedle et al. (1998), verificaram que as resinas compostas são sempre tóxicas quando recém-polimerizadas, efeito que não é persistente em longo prazo.

Quanto à toxicidade das resinas e do condicionamento ácido, Gwinnett e Tay (1998) e Pameijer e Stanley (1998) comprovaram que seu uso pode realmente levar

a polpa à necrose. Esta toxicidade dos adesivos dentinários foi confirmada mais tarde por Stanislawski et al. (2003), que avaliaram a resina em sua forma monomérica, verificando maior morte celular e produção de radicais livres, letais para as células. Em outros estudos, Demarco et al. (2001) e Trope et al. (2002), também verificaram que os adesivos dentinários são sempre mais tóxicos que o hidróxido de cálcio. Por outro lado, esses mesmos autores observaram que um sistema adesivo autocondicionante, apesar de menos compatível que o hidróxido de cálcio, é mais compatível que o sistema adesivo convencional, da mesma forma que observado por Osorio et al. (1998) e Vajrabhaya, Pasasuk e Harnirattisai (2003). Este último trabalho comparou um adesivo dentinário com o MTA e outros materiais endodônticos, observando que o adesivo dentinário apresentou alto grau de citotoxicidade.

Verificando a biocompatibilidade desses materiais sobre a polpa exposta *in vivo*, Hebling, Giro e Costa (1999a, 1999b) e Souza Costa et al. (2000, 2001) observaram que, a aplicação da base de hidróxido de cálcio produzia a reorganização do tecido inflamado com a presença de células semelhantes a odontoblastos e formação de ponte de dentina. No entanto, o uso de sistemas adesivos convencionais ou autocondicionantes aplicados diretamente sobre a polpa exposta promoveu a presença de reação inflamatória severa e persistente, indicando baixa biocompatibilidade desses materiais. Além da ação inflamatória que produzem, os adesivos dentinários podem também provocar apoptose em células da polpa, segundo Kitamura et al. (2003) e Mantellini et al. (2003), o que pode ser indicativo de uma citotoxicidade ainda maior desses materiais. Souza Costa, Mesas e Hebling (2000), com o uso de tubos de polietileno implantados no tecido conjuntivo de ratos,

verificaram que os sistemas adesivos provocam reações inflamatórias intensas, concordando com os estudos que avaliaram a aplicação em polpas expostas.

Murray et al. (2002b), Schuurs, Gruythuysen e Wesselink (2000) e Souza Costa, Hebling e Hanks (2000) afirmam que os sistemas adesivos ainda não estão num estágio de compatibilidade semelhante ao de outros capeadores mas, particularmente aqueles autocondicionantes, possuem futuro promissor no capeamento pulpar direto, necessitando de mais estudos para evitar iatrogenias, fato já inicialmente confirmado por Schmalz et al. (2002). Esta informação quanto ao estágio de desenvolvimento dos adesivos merece consideração, uma vez que Medina III et al. (2002) afirmaram não haver diferenças de biocompatibilidade entre sistemas autocondicionantes e sistemas convencionais, ao contrário de Huang e Chang (2002) que afirmaram que a composição do sistema adesivo é importante no efeito citotóxico que ele produz. Adicionalmente, vale ressaltar que Iványi et al. (2002) afirmaram que o tipo de solvente utilizado não afeta a microcirculação pulpar, apesar de os sistemas adesivos testados terem sido capazes de causar aumento no diâmetro dos vasos.

Outros estudos também foram realizados com o intuito de verificar a a biocompatibilidade de adesivos dentinários, como o de Kiba et al. (2000), que observaram que o condicionamento da dentina com EDTA provoca reações inflamatórias severas sobre a polpa, diferente do que acontece com o uso de um adesivo autocondicionante, que causou reações moderadas que decresceram no decorrer tempo. Esta informação é corroborada por Kitasako et al. (2000), que afirmam que, apesar da capacidade de todos os materiais de induzir a formação de dentina, o hidróxido de cálcio é superior nesta propriedade.

O capeamento da polpa exposta é um procedimento delicado, que deve ser baseado numa seleção criteriosa dos casos, seja para capeamento com hidróxido de cálcio, seja com adesivos dentinários (HEYERAAS; SVEEN; MJÖR, 2001; LIEBENBERG, 1999; MJÖR, 2002). Entende-se como seleção do caso, além de fatores como a capacidade de reação do indivíduo, a quantidade de dentina remanescente, fato descrito como crítico nos estudos de Murray et al. (2003) e Souza Costa et al. (2003), onde quanto menor a espessura dentinária (cerca de até 0,5 mm), maior a reação pulpar.

No estudo de biocompatibilidade de materiais, muitos métodos podem ser utilizados. Conforme estabelecido pela *Fédération Dentaire Internationale* (1980), as análises de materiais usados no âmbito da Odontologia devem seguir uma ordenação descrita em testes iniciais, secundários e de uso. Dentre os testes iniciais, o cultivo celular surge como uma das avaliações possíveis, devendo sempre procurar simular as condições de uso no tecido de destino, conforme descrito por Schmalz (1994). Particularmente no que diz respeito ao estudo de células da polpa e suas reações aos materiais aplicados sobre elas, encontra-se na literatura trabalhos que utilizaram os métodos de cultivo celular, como os de Alliot-Licht, Jean e Gregoire (1994), Nakashima (1992), Schedle et al. (1998) e Schmalz et al. (2002). Apesar do estabelecimento do método, diferenças podem ser encontradas quanto à forma de aplicação das substâncias sobre as células. Dentre essas formas, os estudos de Demarco et al. (2001) e de Huang e Chang (2002) optaram pelo uso de corpos de prova do material capeador a ser testado, ao passo que Schmalz et al. (2002) e Vajrabhaya, Pasasuk e Harnirattisai (2003) escolheram discos de dentina com o material capeador, de modo que não houvesse contato direto do material com as células. As diferenças entre os métodos citados se deve aos objetivos de cada

estudo, uma vez que os primeiros avaliaram o capeamento direto e os últimos avaliaram o capeamento indireto. Um terceiro método, ainda não utilizado em capeamento pulpar, mas descrito por Freshney (2000), consiste no uso de meios condicionados durante a presa, polimerização ou contato com as substâncias, o que, como maior vantagem, seria a simulação de uma situação de contato com camadas mais profundas do tecido, onde não há o contato direto das células com o material e sim com produtos liberados por estes.

Vale ressaltar a grande quantidade de métodos e parâmetros utilizados nos estudos levantados, o que, de certa forma, denota a necessidade do desenvolvimento de novos trabalhos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi observar o efeito citotóxico *in vitro* de substâncias liberadas por materiais capeadores diretos em contato com fibroblastos pulpares humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A reação de fibroblastos de polpas dentárias humanas em cultura, induzidos por substâncias liberadas por materiais utilizados para capeamento pulpar direto, foi analisada por ensaios de viabilidade (curto prazo) e sobrevivência celular (longo prazo). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP sob número 191/03 (Anexo).

4.1 Definição dos grupos experimentais

Para a realização do estudo foram estabelecidos quatro grupos experimentais distribuídos da seguinte forma:

Grupo I: Controle (meio de cultivo sem condicionamento)

Grupo II: Cimento de hidróxido de cálcio

Grupo III: Adesivo dentinário

Grupo IV: Ácido ortofosfórico a 37%

4.2 Preparo das substâncias

O cimento (Life, Kerr, Orange, CA, EUA) (grupo II) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante com espátula nº. 24 e placa de vidro estéril e a seguir aplicado no fundo de um tubo de ensaio de 50 ml de capacidade. No grupo III, o adesivo dentinário (Single Bond, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado com pincel tipo *microbrush* estéril no fundo do tubo de ensaio e fotopolimerizado com aparelho de luz halógena de 600 mW/cm² de potência, por 20 segundos e no grupo IV, o ácido (Dentsply/Caulk, Petrópolis, RJ, Brasil), na forma de gel, foi aplicado diretamente no fundo do tubo de ensaio.

4.3 Condicionamento dos meios de cultivo

O meio condicionado contém todas as substâncias liberadas durante a presa ou polimerização de substâncias evitando o contato direto entre as células e o material a ser testado (FRESHNEY, 2000). Para a produção desses meios, o meio de cultivo foi colocado em contato com as substâncias individualmente durante o período de 1 hora em estufa com atmosfera úmida e temperatura de 37°C. Seguindo o preconizado pela *American Society for Testing and Materials* (1992) para a obtenção dos meios condicionados de estoque utilizou-se 0,2 g de cimento durante sua presa (grupo II) ou polimerização da resina (grupo III) ou contato de ácido em gel para cada 1 ml de meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Sigma Chem.

Co., St. Louis, MO, EUA). Especificamente para o grupo III, a colocação do meio precedeu a polimerização com luz halógena, permitindo a liberação de substâncias nos momentos antes e durante este processo. Os meios de estoque foram aplicados às culturas na diluição de 10%.

4.4 Cultivo celular

Para os experimentos foram utilizadas células FP5, linhagem de fibroblastos estabelecida a partir de polpa dentária humana no Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística. As células foram cultivadas em DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e solução antibiótica-antimicótica a 1% (Sigma). As células foram semeadas em frascos de 25 cm² de área e mantidas em estufa a 37°C, em tensão de 5% de CO₂. Após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas do fundo do frasco com o uso de solução de tripsina a 0,25% (Sigma) em solução tampão fosfato salina (PBS), e semeadas em frascos de 75 cm² de área. Para todos os experimentos, foram utilizadas células que se encontravam entre a quinta e a décima passagens.

4.5 Ensaios de viabilidade e sobrevivência celular

Após o cultivo celular, as células foram destacadas dos frascos com o uso de solução de tripsina a 0,25% PBS e semeadas em placas de Petri de 35 mm de

diâmetro, sendo um total de 3 placas por grupo ($n=4$) e tempo experimental ($n=4$) em cada ensaio (total de 96 placas). Para obtenção das curvas de viabilidade celular foram plaqueadas $1,8 \times 10^3$ células por placa e para as curvas de crescimento 1×10^3 células por placa.

4.5.1 ensaio de curto prazo

Para o teste de curto prazo que verifica a viabilidade celular (percentual de células viáveis sobre o total de células) os meios condicionados foram aplicados em culturas confluentes. As contagens foram realizadas segundo o método de exclusão de células coradas pelo azul de Trypan (Sigma) nos períodos de 0, 6, 12 e 24 horas após a troca dos meios.

Os procedimentos de contagem podem ser descritos da seguinte forma (FRESHNEY, 2000):

- aspiração e reserva do meio e lavagem com PBS;
- aspiração do PBS e descolamento das células das placas com tripsina;
- colocação em estufa a 37°C por 1,5 minuto e inativação da tripsina com o meio reservado;
- centrifugação e aspiração do sobrenadante;
- ressuspensão do precipitado de células em $900\mu\text{l}$ de PBS;
- colocação de $100\mu\text{L}$ de azul de Trypan (corante para as células mortas),
- colocação de uma gota da solução em cada parte de hemocítômetro coberto com lamínula de vidro.

A contagem foi feita na área dos 50 quadrados do hemocitômetro em microscópio invertido de fase, sendo anotados o número total de células e o número de células mortas (coradas em azul). O número de células viáveis é igual ao número total menos o número de células mortas. Para obter a porcentagem de viabilidade celular, primeiramente calculou-se o número total de células, de acordo com a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{número de células} \times 10^4}{50 \text{ (n}^{\circ} \text{ de quadrados contados)}}$$

A seguir, excluindo as células mortas, obteve-se o número de células viáveis pela fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} = \frac{\text{número de células viáveis} \times 10^4}{50 \text{ (n}^{\circ} \text{ de quadrados contados)}}$$

Com os dados de total de células e de células viáveis, dividiu-se o número de células viáveis pelo número total de células e multiplicou-se por 100, obtendo-se assim o percentual de células viáveis de cada placa.

4.5.2 ensaio de longo prazo

Para a análise da curva de crescimento as células foram plaqueadas e após 24 horas as culturas tiveram seus meios trocados pelos meios condicionados. A

seguir, foram realizadas contagens, da forma descrita, em períodos de 1, 3, 5 e 7 dias após a colocação do meio condicionado, sendo que a cada dois dias o meio foi substituído por meio condicionado fresco.

É importante ressaltar que, no caso do grupo IV, o meio condicionado foi mantido em contato com a monocamada de células por 15 segundos, simulando a realidade clínica do uso deste material.

Nesta análise, levou-se em consideração o número absoluto de células viáveis por placa, através da fórmula descrita acima.

4.6 Análise Estatística

Os dados, em triplicata, obtidos nos dois ensaios (valores de percentagem para o ensaio de viabilidade e número de células para o ensaio de crescimento) foram submetidos à análise estatística. Utilizou-se a análise de variância complementada pelo teste de Tukey ambos numa significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados separadamente, de acordo com o ensaio realizado.

5.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular das culturas durante o teste de curto prazo se manteve em torno de 86,46% para o grupo I, 77,24% para o grupo II e 67,18% para o grupo IV. O grupo III apresentou queda acentuada de viabilidade celular chegando em valores próximos a 10% em 12 horas de experimento. O grupo III, apesar de ter mantido viabilidades estáveis e similares às dos grupos I e II, no primeiro tempo experimental (0 hora) apresentou porcentagem de células viáveis estatisticamente inferiores às dos demais grupos. As curvas de viabilidade celular (percentual de células viáveis x tempo) podem ser observadas na figura 5.1.

Figura 5.1 - Curvas de viabilidade (% de células viáveis x tempo)

A análise estatística, cujos parâmetros se encontram na Tabela 5.1, mostra diferenças nos fatores tempo, material e nas interações (Tabela 5.2).

Tabela 5.1 - Análise de variância para o ensaio de viabilidade celular

Fator	GL	Quadrados médios	F	Probabilidade de H_0
Tempo*	3	531,17	7,35	0,09%
Material*	3	7244,79	100,19	0,00%
Interação*	9	672,28	9,30	0,00%
Resíduo	32	72,30	-	-

* Indica os fatores em que houve diferenças estatísticas

No caso do fator material, o adesivo dentinário mostrou-se significativamente mais citotóxico que os demais materiais, e o ácido também apresentou maior citotoxicidade que os grupos controle e hidróxido de cálcio, ficando com um nível intermediário de biocompatibilidade.

Tabela 5.2 - Médias de viabilidade (%) e erros padrões das médias, de acordo com as interações (tempo x material) e identificação das diferenças* de acordo com o valor crítico de Tukey

	0	6	12	24
Grupo I	87,61 ($\pm 0,97$) a	84,04 ($\pm 1,16$) a	86,31 ($\pm 0,60$) a	87,88 ($\pm 6,06$) a
Grupo II	76,39 ($\pm 6,05$) ab	81,95 ($\pm 1,38$) a	77,46 ($\pm 5,64$) a	73,15 ($\pm 3,34$) a
Grupo III	71,47 ($\pm 2,49$) ab	27,77 ($\pm 5,55$) c	12,22 ($\pm 6,19$) c	10,17 ($\pm 6,21$) c
Grupo IV	61,25 ($\pm 4,29$) b	72,71 ($\pm 3,05$) ab	67,79 ($\pm 8,90$) ab	66,94 ($\pm 6,64$) ab

* Letras iguais indicam semelhança estatística (diferença entre médias menor que 25,76)

5.2 Curva de crescimento

As curvas de crescimento estão ilustradas no gráfico da figura 5.2 e seus dados expressos na Tabela 5.3. Todas as culturas, exceto as do grupo III apresentaram crescimento contínuo do primeiro ao terceiro dia, quando tornaram-se estáveis com valores em torno de 3×10^3 células por placa. O grupo III (adesivo dentinário) apresentou queda acentuada do número de células viáveis já em 24 horas após o contato com o meio condicionado, atingindo valores inferiores a 100 células por placa. No grupo IV (ácido) o crescimento foi contínuo e com números inferiores aos dos grupos I e II, porém sem significância estatística. Esse grupo atingiu a confluência total somente entre o terceiro e quinto dias após o contato com o meio condicionado, ao passo que os grupos I e II a atingiram entre o primeiro e o terceiro dias.

Tabela 5.3 - Médias de células viáveis ($\times 10^3$) e erros padrões das médias, de acordo com as interações tempo x material

	1	3	5	7
Grupo I	2,6 ($\pm 0,17$) a	3,4 ($\pm 0,43$) a	3,0 ($\pm 0,33$) a	2,8 ($\pm 0,22$) a
Grupo II	2,5 ($\pm 0,18$) a	3,5 ($\pm 0,40$) a	2,8 ($\pm 0,21$) a	2,7 ($\pm 0,28$) a
Grupo III	0,1 ($\pm 0,06$) b	0,1 ($\pm 0,07$) b	0,3 ($\pm 0,03$) b	0,7 ($\pm 0,03$) b
Grupo IV	2,1 ($\pm 0,21$) a	3,1 ($\pm 1,04$) a	3,6 ($\pm 0,35$) a	3,1 ($\pm 0,42$) a

Letras iguais indicam semelhança estatística

Figura 5.2 - Curvas de crescimento (número de células viáveis x tempo)

Na análise estatística, diferenças foram encontradas somente no fator material (Tabelas 5.3 e 5.4), sendo que neste caso, somente o adesivo dentinário (grupo III) se diferenciou dos outros grupos.

Tabela 5.4 - Análise de variância para o ensaio de curva de crescimento

Fator	GL	Quadrados médios	F	Probabilidade de H₀
Tempo	3	109,74	2,75	5,77%
Material*	3	2416,29	60,60	0,00%
Interação	9	35,46	0,89	45,44%
Resíduo	32	39,87	-	-

* Indica os fatores em que houve diferenças estatísticas

6 DISCUSSÃO

Substâncias liberadas por materiais de capeamento direto causam diferentes efeitos relacionados à citotoxicidade e sobrevivência de fibroblastos cultivados de polpa dentária humana. As substâncias liberadas durante a polimerização de adesivos dentinários são citotóxicas, causando morte celular e perda da capacidade proliferativa das células. Aquelas liberadas pelo ácido ortofosfórico a 37% provocam diminuição da viabilidade somente nos primeiros momentos do contato com as células, enquanto as substâncias liberadas durante a presa do hidróxido de cálcio não são citotóxicas em nenhum momento.

Esse trabalho se valeu de experimentos *in vitro* que constituem o ponto de partida no intuito de se avaliar a citotoxicidade de materiais empregados no âmbito da Odontologia. Segundo a *Fédération Dentaire Internationale* (1980) estes testes, quando realizados em modelo de cultivo celular são classificados em testes iniciais. Para este tipo de análise, tipos celulares diferentes podem ser utilizados e, de acordo com Schmalz (1994), as células primárias possuem potencial metabólico específico mais próximo das condições *in vivo* e por isso, no presente estudo, optou-se pelo uso de células de linhagem primária obtidas a partir de fragmentos de polpa dentária humana.

O objetivo do presente estudo foi comparar *in vitro* os efeitos de substâncias liberadas de materiais utilizados no capeamento pulpar durante os primeiros

momentos do contato desses materiais com células pulpares. Apesar da grande quantidade de estudos com o modelo histopatológico, e talvez até por esta variedade, os resultados são controversos. Mesmo com a validade deste tipo de abordagem, no presente trabalho optou-se por uma análise *in vitro* utilizando-se do cultivo celular, metodologia já consagrada em alguns estudos de substâncias capeadoras pulpares (ALLIOT-LICHT; JEAN; GREGOIRE, 1994; HUANG; CHANG, 2002; MANTELLINI et al., 2003; SCHEDLE et al., 1998; SCHMALZ et al., 2002; STANISLAWSKI et al., 2003; VAJRABHAYA; PASASUK; HARNIRATTISAI, 2003), e que permite o controle das variações entre os espécimes com quantificação precisa, o que nem sempre ocorre quando se analisam dados obtidos de experimentação *in vivo*.

Quanto às avaliações de biocompatibilidade em modelo de cultivo celular, algumas formas de se aplicar o material capeador foram relatadas na literatura. Uma delas consiste em se colocar corpos de prova do material já polimerizado ou com a presa tomada em contato direto com as células (DEMARCO et al., 2001; HUANG; CHANG, 2002). Outra forma, mais específica para estudar o efeito dos materiais simulando uma situação indireta, ou seja, sem exposição pulpar, foi descrita, sendo que nesta as substâncias são aplicadas sobre discos de dentina e estes colocados em contato com as células (SCHMALZ et al., 2002; VAJRABHAYA; PASASUK; HARNIRATTISAI, 2003). Um terceiro método de se aplicar os capeadores consistiria no uso de meios condicionados, que permite que substâncias liberadas durante o processo de presa ou polimerização dos materiais sejam concentradas no meio de cultivo. Assim, esse meio pode ser colocado sobre as células sem que ocorra o contato direto com o material (FRESHNEY, 2000).

O uso de meios condicionados para análise de citotoxicidade, é provavelmente o método mais indicado para análise de capeadores pulpares diretos. Apesar da ausência de estudos que utilizassem meios condicionados com este propósito, deve-se levar em consideração o fato de que os materiais utilizados neste procedimento são colocados sobre o tecido sem estarem com sua presa ou polimerização terminadas. Além disso, pelo contato com o meio úmido dos tecidos, os processos de presa ou polimerização poderiam ser retardados ou impedidos, permitindo a liberação de substâncias nocivas para as células, principalmente numa camada mais profunda do tecido (MANTELLINI et al., 2003; STANISLAWSKI et al., 2003). E, condicionando o meio de cultivo durante a presa ou polimerização desses materiais, estar-se-ia mimetizando *in vitro* o que ocorre abaixo do material na sub-zona de contato do capeador com o tecido pulpar. Por estas razões, optou-se pelo uso de meios condicionados pelas substâncias liberadas durante a presa ou polimerização dos materiais capeadores, de modo a simular uma situação clínica e introduzir uma nova metodologia para se avaliar a citotoxicidade dessas substâncias.

Com a metodologia proposta, os resultados do presente estudo mostraram alta citotoxicidade do sistema adesivo. Deve-se destacar que os estudos de Demarco et al. (2001) e de Huang e Chang (2002), que se valeram do uso de corpos de prova dos materiais em cultura, mostraram valores de citotoxicidade menores. Dessa forma, podemos inferir que essa diferença de resultados reside no fato de nesses estudos a polimerização dos adesivos ter sido realizada antes do contato com as células. Os estudos de Schmalz et al. (2002) e Vajrabhaya, Pasasuk e Harnirattisai (2003) também encontraram valores de viabilidade maiores que o presente estudo, mas na presença de uma barreira dentinária, o que certamente diminui a citotoxicidade das substâncias. Esses achados mostram que o nível de

citotoxicidade é dependente da forma de aplicação do material às culturas. Concordando com Schmalz (1994), as substâncias devem ser aplicadas às culturas celulares da mesma forma que são aplicadas no paciente. Assim, se o material vai polimerizar em contato com o tecido, ele pode ser testado após sua polimerização, mas certamente deve ser também testado durante a mesma.

É importante destacar que no momento da colocação do meio sobre o adesivo a camada superficial da resina se dissolveu, o que sustenta a tese de que a camada em contato direto com o tecido provavelmente se difunde neste. No ensaio piloto, esta formulação provou ser altamente citotóxica o que exigiu, para a realização do experimento, a diluição do meio condicionado para 10%. Essa diluição se justifica no fato de que no tecido, o contingente celular é bastante superior àquele das placas de cultura. Além disso, o sistema vascular ajuda ativamente na diluição dessas substâncias *in vivo*, o que não ocorre *in vitro*. Mesmo com os meios diluídos, os resultados apresentados, tanto em curto como em longo prazo, indicaram alta citotoxicidade do sistema adesivo testado, comparada aos outros grupos. Isso comprova a capacidade de mimetização do método que utiliza meios condicionados, já que numa observação da literatura, verifica-se que, naqueles estudos histopatológicos que constataram baixa biocompatibilidade dos sistemas adesivos, houve um grande índice de inflamação e morte pulpar (GWINNETT; TAY, 1998; HEBLING; GIRO; COSTA, 1999a; KIBA et al., 2000; PAMEIJER; STANLEY, 1998; SOUZA COSTA et al., 2001).

Nos testes realizados nesse trabalho, utilizou-se do azul de Trypan, que só cora células que tiveram rompimento de membrana, ou seja, só foi quantificada a morte celular que ocorreu por necrose. Dessa forma, o índice de real morte celular pode estar até sendo subestimado, já que alguns autores constataram que além de

necrose, os sistemas adesivos causam morte celular por apoptose (KITAMURA et al., 2003; MANTELLINI et al., 2003).

Outro dado importante é relacionado ao tipo de adesivo dentinário utilizado. No presente estudo foi escolhido um sistema adesivo monocomponente, cuja base resinosa é composta por BIS-GMA e HEMA, e que utiliza como veículo o álcool. Apesar de um estudo não ter encontrado diferenças quanto à ação citotóxica de diferentes solventes (IVÁNYI et al., 2002), pode-se esperar uma variabilidade também quanto aos resultados de citotoxicidade de diferentes adesivos, pela grande quantidade de formulações de bases existentes no mercado (HUANG; CHANG, 2002). Somente para efeito de comparação, sabe-se que sistemas adesivos autocondicionantes possuem menor efeito citotóxico que sistemas monocomponentes (DEMARCO et al., 2001; FUJITANI et al., 2002; KIBA et al., 2000; MURRAY et al., 2002b; VAJRABHAYA; PASASUK; HARNIRATTISAI, 2003), o que é provavelmente decorrente da base destas resinas. Com isso, em estudos que utilizem sistemas de marcas comerciais distintas, os resultados podem ser da mesma forma distintos. Vale ressaltar que a alta citotoxicidade de adesivos pode ser devida também a presença de radicais fenólicos na estrutura do BIS-GMA.

Nos resultados do presente estudo, observou-se que o cimento de hidróxido de cálcio praticamente não provocou alterações no comportamento das células, uma vez que os valores de viabilidade e sobrevivência verificados são muito semelhantes aos dados do grupo controle. Isso pode ocorrer pelo fato de que, durante sua presa, o cimento testado não liberou substâncias nocivas às células. Além disso, o pH baixo do hidróxido de cálcio não foi muito evidente no cimento, uma vez que este praticamente não alterou a cor do fenol vermelho presente no meio de cultivo. Esse resultado corrobora com os encontrados na literatura no que diz respeito à

reparação provocada pelo hidróxido de cálcio, fato confirmado pela maior parte dos estudos levantados (DEMARCO et al., 2001; HEBLING; GIRO; COSTA, 1999a; KIBA et al., 2000; KITASAKO et al., 2000, 2002; MEDINA III et al., 2002; MURRAY et al., 2002b; PAMEIJER; STANLEY, 1998; SOUZA COSTA et al., 2001, 2003; TARIM et al., 1998; TROPE et al., 2002).

O grupo experimental que testou a citotoxicidade do ácido ortofosfórico foi introduzido neste estudo, mesmo não sendo um capeador pulpar direto, porque o ácido é comumente utilizado sobre o tecido pulpar quando da realização de hibridização com resinas. Diferentemente do esperado, um dado importante aparece nos resultados: o de que o ácido apresentou um efeito menor do que o citado em vários estudos (PAMEIJER; STANLEY, 1998; STANLEY; GOING; CHAUNCEY, 1975), sendo citotóxico apenas em um momento inicial, dado comprovado pelo experimento de curto prazo. Esse resultado poderia ter sido devido até mesmo pelo fato de o meio condicionado com ácido ter sido mantido em contato com as células por apenas 15 segundos. A biocompatibilidade do ácido também foi demonstrada através da curva de crescimento que foi contínua alcançando a confluência cerca de 48 horas depois dos grupos controle e do hidróxido de cálcio. Obviamente, se mantido em contato durante todo o experimento, poder-se-ia verificar dados semelhantes aos observados com o adesivo dentinário, mas sem aplicação clínica, uma vez que o ácido é lavado das cavidades, não devendo ser mantido por mais de 15 segundos em contato com a dentina.

Respondendo ao questionamento desse estudo foi mostrado que entre os capeadores pulparem diretos testados, as substâncias liberadas durante a polimerização do adesivo dentinário apresentaram maior efeito citotóxico quando comparadas com os demais materiais testados. Isso significa que os resultados

observados *in vivo*, como inflamação e necrose tecidual (GWINNETT; TAY, 1998; PAMEIJER; STANLEY, 1998; STANLEY; GOING; CHAUNCEY, 1975) podem estar mais relacionadas à liberação de substâncias durante a polimerização desses adesivos do que da sua presença após a polimerização, quando a sua citotoxicidade diminui, como descrito na literatura. Dessa forma, comprova-se que o método escolhido para esse estudo trouxe uma contribuição no entendimento da ação do adesivo dentinário quando em contato com a polpa. Portanto, pode-se crer que a metodologia do uso de meios condicionados para testes de citotoxicidade devem ser sempre implementados na análise de materiais que entram em contato com os tecidos, que são úmidos e podem solubilizar essas substâncias liberando possíveis agentes citotóxicos.

Com certeza novos estudos são necessários para se verificar o grau de citotoxicidade de substâncias usadas no capeamento pulpar direto, principalmente pelo fato de que novos sistemas são freqüentemente lançados no mercado. Além disso, outros materiais, que não adesivos, poderiam ser utilizados para este fim, como por exemplo o agregado de trióxidos minerais (MTA) que, com resultados semelhantes e algumas vezes melhores que os do hidróxido de cálcio (AIEHNECHI et al., 2002; DOMINGUEZ et al., 2002; FARACO; HOLLAND, 2001; PITT FORD et al., 1996), merece ser avaliado mais a fundo como capeador, apesar de seu alto custo. Adicionalmente, outras substâncias como a hidroxiapatita e a proteína morfogenética óssea (BMP) também apresentam resultados satisfatórios no capeamento pulpar direto (ALLIOT-LICHT; JEAN; GREGOIRE, 1994; NAKASHIMA, 1992), fato que, com mais estudos e acessibilidade a estes produtos aumentaria o arsenal do cirurgião dentista no tratamento das exposições pulpares com melhor resposta tecidual.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais do presente estudo, conclui-se que substâncias liberadas durante a polimerização do adesivo dentinário, bem como durante o contato inicial do ácido ortofosfórico a 37% são citotóxicas para as células pulpares humanas *in vitro*. Ao contrário, o cimento de hidróxido de cálcio não libera substâncias citotóxicas durante sua presa.

REFERÊNCIAS¹

Aiehnechi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2002;36(3):225-31.

Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsuki M, Suzuki S et al. Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quintessence Int* 1998;29(3):177-88.

Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 1994;39(6):481-9.

American Society for Testing and Materials. Annual Book of ASTM Standards. Medical Devices. West Conshohocken: ASTM; 1992. [v.13.01, p. 172-6]

Brännström M, Vojinovic O. Response of The dental pulp to invasion of bacteria around three filling materials. *J Dent Child* 1976;43(2):15-21.

Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 6th ed. Saint Louis: Mosby; 1994.

Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc* 1994;125(7):823-31.

Cox CF, Suzuki S, Suzuki SH. Biocompatibility of dental adhesives. *J Calif Dent Assoc* 1995;23(8):35-41.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Cox CF, Subay RK, Suzuki S, Suzuki SH, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials: pulp healing with a surface seal. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;18(1):86-99.

Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998;11(spec no.):S55-63.

Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Mills JC. Biological basis for clinical success: pulp protection and the tooth-restoration interface. *Pract Periodontol Aesthet Dent* 1999;11(7):819-26.

Demarco FF, Tarquínio SBC, Jaeger MMM, Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int* 2001;32(3):211-20.

Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Dent* 2002;30(7-8):297-304.

Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17(4):163-6.

Fédération Dentaire Internationale. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30(2):140-88.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th ed. Indianapolis: Wiley-Liss; 2000.

Fujitani M, Shibata S, Van Meerbeerk B, Yoshida Y, Shintani H. Direct adhesive pulp capping: histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *Am J Dent* 2002;15(6):395-402.

Gwinnett AJ, Tay FR. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent* 1998;11(Spec no.):S35-44.

Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 1999a;25(10):676-82.

Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent* 1999b;27:557-64.

Heyeraas KJ, Sveen OB, Mjör IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 3: Pulpal inflammation and its sequelae. *Quintessence Int* 2001;32(8):611-25.

Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 2001;12(2):109-13.

Huang FM, Chang YC. Citotoxicity of dentin bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J* 2002;35(11):905-9.

Iványi I, Balogh ÁE, Fazekas Á, Rosivall L, Nyárasdy I. Comparative analysis of pulpal circulatory reaction to an acetone-containing and an acetone-free bonding agent as measured by vitalmicroscopy. *Oper Dent* 2002;27(4):367-72.

Kiba H, Hayakawa T, Nakanuma K, Yamazaki M, Yamamoto H. Pulpal reactions to two experimental bonding systems for pulp capping procedures. *J Oral Sci* 2000;42(2):69-74.

Kitamura C, Ogawa Y, Morotomi T, Terashita M. Differential induction of apoptosis by capping agents during pulp wound healing. *J Endod* 2003;29(1):41-3.

Kitasako Y, Shibata S, Pereira PN, Tagami J. Short-term dentin bridging of mechanically-exposed pulps capped with adhesive resin systems. *Oper Dent* 2000;25(3):155-62.

Kitasako Y, Shibata S, Cox CF, Tagami J. Location, arrangement and possible function of interodontoblastic collagen fibres in association with calcium hydroxide-induced hard tissue bridges. *Int Endod J* 2002;35(12):996-1004.

Liebenberg WH. Intentional pulp capping: a clinical perspective of the adhesive experience. *J Adhes Dent* 1999;1(4):345-63.

Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003;82(8):592-6.

Medina III VO, Shinkai K, Shirono M, Tanaka N, Katoh Y. Histopathologic study on pulp response to single-bottle and self-etching adhesive systems. *Oper Dent* 2002;27(4):330-42.

Mjör IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence Int* 2002;33(2):113-35.

Murray PE, Hafez AA, Windsor LJ, Smith AJ, Cox CF. Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *J Dent* 2002a;30(5-6):213-22.

Murray PE, Kitasako Y, Tagami J, Windsor LJ, Smith AJ. Hierarchy variables correlated to odontoblast-like cell numbers following pulp capping. *J Dent* 2002b;30(7-8):297-304.

Murray PE, Smith AJ, Windsor LJ, Mjör IA. Remaining dentin thickness and human pulp responses. *Int Endodont J* 2003;36(1):33-43.

Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982;16(3):265-71.

Nakashima M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1992;73(4):484-9.

Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod* 1998;24(2):91-6.

Pameijer CH, Stanley HR. The disastrous effects of the "total etch" technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 1998;11(Spec no.):S45-54.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127(10):1491-4.

Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 1998;14(11):429-40.

Schmalz G. Use of cell cultures for citotoxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent* 1994;22(2):S6-11.

Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Citotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* 2002;28(3):188-92.

Schuurs AH, Gruythuysen RJ, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol* 2000;16(6):240-50.

Souza Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater* 2000;16(3):188-97.

Souza Costa CA, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000;13(2):81-7.

Souza Costa CA, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive systems. *J Endod* 2000;26(9):512-6.

Souza Costa CA, Lopes do Nascimento AB, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater* 2001;17(3):230-40.

Souza Costa CA, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex to a resin-modified glass-ionomer and a bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mater* 2003;19(8):739-46.

Stanislawski L, Lefevre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A. TEGMA-induced citotoxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res* 2003;66A(33):476-82.

Stanley HR, Going RE, Chauncey HH. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *J Am Dent Assoc* 1975;91(4):817-25.

Tarim B, Hafez AA, Suzuki SH, Suzuki S, Cox CF. Biocompatibility of Optibond and XR-Bond adhesive systems in nonhuman primate teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18(1):86-99.

Trope M, McDougal R, Levin L, May Jr. KN, Swift Jr. EJ. Capping the inflamed pulp under different clinical conditions. *J Esthet Restor Dent* 2002;14(6):349-57.

Vajrabhaya L, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003;28(4):440-4.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Tabela Ap. A1 - Dados originais do experimento de viabilidade celular (%)

	0 h	6 h	12 h	24 h
Grupo I (Controle)	85,71	84,61	85,71	81,82
	88,23	85,71	87,5	100
	88,89	81,82	85,71	81,82
Grupo II (Life)	75	84,61	85,71	75
	87,5	80	66,67	77,78
	66,67	81,25	80	66,67
Grupo III (Single Bond)	66,67	33,33	16,67	9,09
	75	16,67	0	21,42
	72,73	33,33	20	0
Grupo IV (H₃PO₄ 37%)	54,54	66,67	76,92	58,33
	60	75	76,47	80
	69,23	76,47	50	62,5

Tabela Ap. A2 - Dados originais do experimento de curva de crescimento (número de células x 10³)

	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias
Grupo I (Controle)	2,9	3,4	3,2	2,5
	2,3	4,1	3,5	2,6
	2,6	2,6	2,4	3,2
Grupo II (Life)	2,9	3,8	2,5	2,9
	2,3	4,0	3,2	2,8
	2,5	2,7	2,7	2,0
Grupo III (Single Bond)	0,2	0,1	0,1	0,1
	0	0,1	0	0,1
	0,1	0,3	0	0
Grupo IV (H₃PO₄ 37%)	1,8	1,1	4,3	3,9
	2,0	4,6	3,5	2,9
	2,5	3,6	3,1	2,5

ANEXO

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa