

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/07/2023.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabela dos Reis Souza

Influência do substrato dentinário humano e bovino sobre a citotoxicidade de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabela dos Reis Souza

Influência do substrato dentinário humano e bovino sobre a citotoxicidade de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2021

S729i

Souza, Isabela dos Reis

Influência do substrato dentinário humano e bovino sobre a citotoxicidade de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas / Isabela dos Reis Souza. -- Araraquara, 2021
105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa

1. Polpa dentária. 2. Cimentos dentários. 3. Toxicidade. 4. Dentina.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Isabela dos Reis Souza

Influência do substrato dentinário humano e bovino sobre a citotoxicidade de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Diana Gabriela Soares dos Passos

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Janaina Habib Jorge

Araraquara, 08 de julho de 2021.

DADOS CURRICULARES

Isabela dos Reis Souza

NASCIMENTO: 10 de abril de 1995, Mogi Guaçu, São Paulo

FILIAÇÃO: Mara Rosana Silvério dos Reis Souza
Donizete Aparecido de Souza

2014/2018: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2019/2021: Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico este trabalho à minha família que esteve presente em todos os momentos,
me apoiando e inspirando.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela graça da vida e por todas as oportunidades que me foram dadas.

Aos meus pais **Mara Rosana Silvério dos Reis Souza e Donizete Aparecido de Souza**, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Por sempre terem me apoiado e me dado forças em cada momento.

Ao meu irmão **Bruno dos Reis Souza**, que sempre me ouviu, apoiou e incentivou.

Aos **meus familiares** por todo apoio que recebi e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por me orientar desde a iniciação científica e contribuir para meu crescimento profissional.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, **Maria Luísa de Alencar e Silva Leite e Rafael Antonio de Oliveira Ribeiro**, por todo apoio e tempo dedicado à realização do meu projeto de mestrado, pela aprendizagem das metodologias laboratoriais e por todos os ensinamentos transmitidos.

À **Taisa Nogueira Pansani**, por estar presente na minha vida acadêmica desde a iniciação científica me ajudando no que fosse preciso, por todos os ensinamentos transmitidos, pelos conselhos e incentivos.

À **Profa. Dra. Josimeri Hebling** pelas contribuições prestadas durante o desenvolvimento do meu projeto de Mestrado, mostrando-se sempre muita solícita e atenciosa durante a execução da pesquisa.

À **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso** por estar presente na minha vida acadêmica desde a iniciação científica, pela aprendizagem das metodologias

laboratoriais, bem como, pelas contribuições prestadas durante o desenvolvimento da pesquisa de Mestrado.

Aos meus amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, **Fernanda, Lais, Igor, Caroline, Uxua, Larissa, Marlon e Beatriz**, com quem convivo diariamente.

Aos amigos do **Mestrado** em Reabilitação Oral 2019/2021 pelos momentos de descontração e união.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, nas pessoas do atual Diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** e Vice-diretora **Profa. Dra. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Coordenadora **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina** e pela Vice coordenadora **Profa. Dra. Daniela Aparecida Godoi Gonçalves**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo Coordenador **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** e pelo Vice coordenador **Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri**.

Aos Professores do **Programa de Reabilitação Oral** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, os quais foram sempre solícitos para comigo.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(Processo nº 2019/05788-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa
pesquisa.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a conquista dessa etapa em
minha vida, muito obrigada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Souza IR. Influência do substrato dentinário humano e bovino sobre a citotoxicidade de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Devido às questões éticas e à dificuldade de se obter dentes humanos íntegros, pesquisadores têm usado dentes bovinos para avaliar as propriedades físicas e mecânicas de diferentes materiais dentários. Todavia, ainda não está comprovado se este modelo de dente animal também pode ser usado, com segurança, para determinar *in vitro*, as propriedades biológicas de materiais e produtos recomendados para aplicação sobre o substrato dentinário. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a citotoxicidade transdentinária de diferentes materiais resinosos usados para cimentação de peças protéticas, bem como determinar, por meio de um modelo laboratorial que mimetiza situações clínicas, se a dentina bovina (DB) tem potencial para substituir a dentina humana (DH) em testes biológicos de toxicidade indireta. Para tanto, discos padronizados de DB e DH (0,4 mm de espessura) foram adaptados em dispositivos que simulam câmaras pulpares artificiais (CPAs), as quais foram colocadas, individualmente, em placas de 24 compartimentos. Em seguida, células odontoblastóides MDPC-23 foram semeadas na superfície pulpar dos discos. Após 48 horas de incubação, os cimentos resinosos foram aplicados na superfície oclusal dos discos, o que possibilitou estabelecer os seguintes grupos: **G1**- DH sem tratamento (controle negativo); **G2**- DB sem tratamento (controle negativo); **G3**- Single Bond Universal sobre DH (controle positivo); **G4**- Single Bond Universal sobre DB (controle positivo); **G5**- RelyX Luting 2 sobre DH; **G6**- RelyX Luting 2 sobre DB; **G7**- RelyX U200 sobre DH; **G8**- RelyX U200 sobre DB; **G9**- RelyX Ultimate sobre DH; e **G10**- RelyX Ultimate sobre DB. Células MDPC-23, bem como células da polpa dentária humana (HDPCs), também foram semeadas em compartimentos de placas esterilizadas de 96 compartimentos. Após 24 horas de incubação, os efeitos tóxicos foram determinados nas células MDPC-23 semeadas sobre os discos por meio da análise de viabilidade (AlamarBlue) e morfologia celular (MEV). Os extratos (meio de cultura + componentes dos materiais que se difundiram pelos discos) foram coletados e aplicados sobre as MDPC-23 e HDPCs semeadas nos compartimentos. Essas células foram avaliadas quanto a viabilidade (Live/Dead), adesão e espalhamento celular (F-actina), atividade de fosfatase alcalina (ALP, Timolftaleína Monofosfato) e deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red). Os dados numéricos obtidos foram submetidos aos testes estatísticos ANOVA a um critério, complementados por Tukey (nível de significância de 5%). A maior redução na viabilidade das células MDPC-23 cultivadas sobre os discos de dentina ocorreu quando o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e o cimento RelyX Luting 2 (G5 e G6) foram usados em comparação aos respectivos controles negativos (G1 e G2, $p < 0,05$). Não se observou diferença entre os materiais quando eles foram aplicados sobre DH ou DB ($p > 0,05$). Redução significativa da viabilidade, adesão e atividade de ALP pelas

células MDPC-23 cultivadas nos compartimentos, ocorreu nos grupos G3, G4, G5, G6, G9, G10, quando comparados a G1 e G2 ($p < 0,05$). Porém, G7 e G8 foram estatisticamente semelhantes aos controles G1 e G2 ($p > 0,05$). Redução significativa da viabilidade, adesão e atividade de ALP pelas HDPCs ocorreu nos grupos G5 e G6 quando comparados a G1 e G2 ($p < 0,05$). De maneira geral, foi observado que as células MDPC-23 são mais sensíveis aos extratos dos cimentos resinosos do que as HDPCs. Não houve diferença significativa de citotoxicidade quando os mesmos materiais resinosos foram aplicados na superfície oclusal dos discos de DH e DB ($p > 0,05$). De acordo com a metodologia usada e baseado nos resultados obtidos nesse estudo laboratorial, foi possível concluir que o cimento RelyX U200 foi o único material resinoso não citotóxico testado, sendo que para este modelo de teste in vitro de citotoxicidade indireta, dentina bovina pode ser usada para substituir dentina humana.

Palavras – chave: Polpa dentária. Cimentos dentários. Toxicidade. Dentina.

Souza IR. Influence of the human and bovine dentin substrates on the cytotoxicity of resin luting materials used for cementation of prosthetic parts [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Based upon ethical questions and because of the difficulty of getting intact human teeth, researchers have employed bovine teeth to assess some physic and mechanic properties of diverse dental materials. However, lack of scientific data about using such animal teeth model for biological tests of products recommended to be applied on different teeth substrates still remains. Therefore, the aim of this study was to evaluate and compare the transdental cytotoxicity of different resin luting cements as well as to use an *in vitro* model that mimic clinical situations to determine whether bovine dentin (BD) has potential to replace human dentin (HD) for biological tests of indirect toxicity. For this purpose, standardized HD and BD discs (0.4 mm thick) were adapted in artificial pulp chamber devices (APCs), which were individually placed in wells of 24-well plates. Then, odontoblast-like MDPC-23 cells were seeded on the pulpal surface of the dentin discs. After 48-hour incubation, the luting cements were applied on the occlusal surface of the discs, giving rise to the following groups: **G1**- No treatment on HD (negative control); **G2**- No treatment on BD (negative control); **G3**- Single Bond Universal on HD (positive control); **G4**- Single Bond Universal on BD (positive control); **G5**- RelyX Luting 2 on HD; **G6**- RelyX Luting 2 on BD; **G7**- RelyX U200 on HD; **G8**- RelyX U200 on BD; **G9**- RelyX Ultimate on HD; and **G10**- RelyX Ultimate on BD. MDPC-23 cells as well as human dental pulp cells (HDPCs) were also seeded in wells of 96-well plates. After 24 hours incubation, the transdental toxicity on the MDPC-23 cells seeded at the pulp side of the discs was immediately determined by the analysis of cell viability (AlamarBlue assay) and morphology (SEM). The extracts (culture medium + components released from the dental materials that diffused through the dentin discs) were collected and applied on the MDPC-23 cells and HDPCs seeded in wells. Then, these cells were assessed concerning their viability (Live/Dead assay), adhesion and spreading (F-actin), as well as the phenotypic expression of alkaline phosphatase (ALP, thymolphthalein monophosphate) and mineralized nodules formation (Alizarin Red). MN). The numerical data were submitted to ANOVA one-way statistical tests, complemented by Tukey (significance level of 5%). Lower viability of the MDPC-23 cells seeded on dentin was observed after using Single Bond Universal (G3 and G4) and RelyX Luting 2 (G5 e G6) in comparison with their respective negative controls (G1 and G2, $p < 0.05$). There was no significant difference between each dental material when they were applied on HD or BD ($p > 0.05$). The viability of those MDPC-23 cells seeded in wells, as well as their adhesion, spreading and ALP activity was significantly lower in G3, G4, G5, G6, G9 and G10 than in G1 and G2 ($p < 0.05$). However, G7 and G8 were not different from the controls G1 and G2 ($p > 0.05$). The viability, adhesion, spreading and ALP activity of the HPDCs was significantly lower in G5 and G6 than in G1 and G2 ($p < 0.05$). Overall, the MDPC-23 cells were more sensitive to the extracts obtained from the dental materials assessed in this study than

the HDPCs. No statistical difference occurred when the same dental material was applied on HD or BD ($p>0.05$). According to the methodology used and the results obtained in this laboratory investigation, one may conclude that only RelyX U200 luting cement does not cause transdentinal toxic effects to pulp cells and that bovine dentin can be employed to replace human dentin for assessing the indirect cytotoxicity of resin-based luting cements.

Key-words: Dental pulp. Dental cement. Toxicity. Dentin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Substrato Dentinário Humano e Bovino.....	20
3.2 Materiais Resinosos Utilizados para Cimentação de Peças Protéticas	24
4 MATERIAL E MÉTODO	29
4.1 Preparação das CPAs	29
4.1.1 Obtenção dos discos de DH	29
4.1.2 Obtenção dos discos de DB	30
4.1.3 Padronização dos discos de dentina	31
4.1.4 Morfologia dos discos de dentina	32
4.2 Citotoxicidade Transdentinária	34
4.2.1 Materiais resinosos	34
4.2.2 Análise de pH	36
4.2.3 Cultivo de células odontoblastóides- MDPC- 23	37
4.2.4 Procedimentos experimental	37
4.2.5 Viabilidade das células MDPC-23	44
4.2.6 Morfologia das células MDPC- 23	44
4.2.7 Viabilidade das células MDPC- 23	45
4.2.8 Adesão/espalhamento das células	45
4.2.9 Avaliação da expressão fenotípica	46
4.3 Citotoxicidade Transdentinária	48
4.3.1 Cultura primária de HDPCs	48
4.3.2 Procedimento experimental	50
4.3.3 Citotoxicidade dos extratos	52

4.3.4 Citotoxicidade dos extratos	52
4.3.5 Adesão/espalhamento das HDPCs	52
4.3.6 Expressão fenotípica das HDPCs	52
4.4 Análise dos Dados	53
5 RESULTADOS	55
5.1 Morfologia dos Discos de DB e DH.....	55
5.2 Análise de pH.....	56
5.3 Citotoxicidade Transdentinária (MDPC-23).....	58
5.3.1 Morfologia das células cultivadas sobre dentina	58
5.3.2 Viabilidade das células MDPC- 23	62
5.3.3 Viabilidade das células MDPC- 23	63
5.3.4 Adesão/espalhamento das células MDPC-23	65
5.3.5 Expressão fenotípica das células MDPC- 23	66
5.4 Citotoxicidade Transdentinária.....	70
5.4.1 Citotoxicidade dos extratos	70
5.4.2 Viabilidade das HDPCs	71
5.4.3 Adesão/espalhamento das células	72
5.4.4 Expressão fenotípica das células HDPCs	74
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXO	104

1 INTRODUÇÃO

Com o objetivo de dar segurança ao uso clínico de diferentes materiais dentários recomendados para aplicação sobre o substrato dentinário, evitando que estes produtos ou seus componentes causem danos para a polpa, o primeiro passo é analisar a citotoxicidade deles em modelos experimentais *in vitro*. Para realizar este tipo de estudo laboratorial, é possível empregar estratégias que se aproximem da prática clínica, como, por exemplo, o uso de barreira dentinária de variadas espessuras, as quais podem simular cavidades de distintas profundidades¹⁻³.

Assim, a utilização de discos de dentina acoplados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) tem se mostrado como um modelo experimental eficaz para avaliar e comparar a citotoxicidade transdentinária de novos materiais dentários e suas diferentes técnicas de aplicação^{3,4-6}. Neste modelo de pesquisa *in vitro*, discos de dentina obtidos de molares humanos íntegros são padronizados de acordo com o objetivo do estudo e inseridos, individualmente, nas CPAs. Então, células odontoblastóides podem ser cultivadas sobre a superfície pulpar desses discos, sendo desta maneira mantidas em contato com o meio de cultura. Por outro lado, a superfície oposta dos discos (oclusal) permanece exposta para receber os tratamentos experimentais^{3,6}. Uma outra importante vantagem metodológica para este tipo de teste biológico indireto é que as amostras também podem ser padronizadas quanto à permeabilidade, fator este diretamente relacionado com a intensidade da difusão de componentes dos materiais experimentais^{2,8,9}. Desta maneira, diferentes materiais dentários ou técnicas de aplicação podem ser testados em situações laboratoriais estandardizadas que simulam cavidades de diferentes profundidades³.

Há alguns anos, limitações éticas e a dificuldade de se obter dentes humanos hígidos e em quantidade suficiente para realizar este tipo de pesquisa científica tem levado pesquisadores a utilizar discos de dentina provenientes de dentes bovinos¹⁰⁻¹³. É importante ressaltar que, além da ampla disponibilidade de dentes bovinos para uso em pesquisas laboratoriais, este modelo animal permite que vários discos de dentina possam ser obtidos de um único dente, o que não é possível com dentes humanos¹⁴. Estudos prévios demonstraram que o dente bovino apresenta aspectos morfológicos semelhantes ao dente humano^{15,16}. Também foi relatado similaridades quanto a composição química¹⁷, bem como teor de cálcio e fósforo¹⁸, quando dentes

humanos e bovinos foram comparados. Schilke et al.¹⁵ (2000) verificaram que não há diferença significativa em relação à quantidade de túbulos por área (mm²) e ao diâmetro dos túbulos nas camadas de dentina coronária de molares humanos e de incisivos centrais bovinos. Além disso, estudos anteriores demonstraram similaridades entre dentina bovina (DB) e dentina humana (DH) quanto ao coeficiente de expansão térmica¹⁹, resistência de união à microtração^{20,21}, desenvolvimento e inibição de lesões cariosas²², erosivas e abrasivas¹⁴, propriedades mecânicas²³ e permeabilidade²⁴. Desta maneira, esses dados científicos anteriores demonstraram que a DB tem grande potencial para substituir a DH em pesquisas *in vitro* relacionadas às análises de propriedades físicas, mecânicas e biológicas de materiais dentários²⁵.

Algumas modalidades de terapia, como a reabilitação oral por meio de restaurações indiretas, requerem desgastes das estruturas dentárias ou confecção de cavidades que favoreçam a retenção e estabilidade pós-cimentação das peças protéticas²⁶. Diante desta necessidade técnica específica, a remoção mecânica dos tecidos mineralizados do dente pode expor um grande número de túbulos dentinários altamente permeáveis³. Portanto, a seleção de um agente cimentante biocompatível parece ser fundamental para o sucesso do procedimento clínico³.

Os cimentos de ionômero de vidro modificados ou não por resina, bem como os cimentos resinosos, são materiais dentários amplamente empregados para cimentação de restaurações indiretas e peças protéticas^{27,28}. Os primeiros apresentam diversas vantagens, como coeficiente de expansão térmica e módulo de elasticidade semelhante à dentina, além de comprovada liberação de flúor e adesão ao substrato dentinário²⁹⁻³¹. De Munck et al.³² (2004a) demonstraram que a interação química entre componentes dos cimentos de ionômero de vidro com o tecido dentinário resulta na formação de cristais na embocadura dos túbulos dentinários. Este fato pode reduzir a permeabilidade da dentina e prevenir a ocorrência de efeitos citotóxicos para células pulpares, especialmente quando os materiais são aplicados em cavidades profundas³. Entretanto, os cimentos ionoméricos apresentam baixa resistência mecânica quando comparados aos cimentos resinosos³³.

Uma categoria específica de cimentos resinosos, denominada cimentos autoadesivos, foi introduzida na Odontologia com o objetivo de eliminar a necessidade de pré-tratamento das superfícies dentárias³⁴. Diferentemente dos cimentos resinosos convencionais, os quais requerem a prévia aplicação de um sistema adesivo sobre a

dentina, os cimentos autoadesivos não necessitam de qualquer pré-tratamento dos substratos dentários, sendo este material manipulado e aplicado em passo único³⁴. O mecanismo de adesão desses cimentos é baseado na ação de monômeros acídicos, os quais simultaneamente desmineralizam e se infiltram no esmalte e dentina³⁵⁻³⁷. Nesse protocolo, a *smear layer* não é removida e a sensibilidade pós-operatória não é esperada³⁸. Como os cimentos resinosos autoadesivos não necessitam dos passos clínicos de condicionamento ácido e/ou fotoativação, esta categoria de produtos se apresenta como uma alternativa clínica interessante. Isto porque, além de reduzir o tempo do procedimento restaurador, seu uso poderia, hipoteticamente, prevenir a difusão transdentinária de monômeros residuais, evitando danos às células pulpares³⁸. Num estudo *in vivo*, realizado em pré-molares humanos íntegros, foi demonstrado que a aplicação do cimento autoadesivo RelyX Unicem™ (3M ESPE) em cavidades muito profundas, causou nenhuma ou discreta reação inflamatória pulpar³⁸. Nos dentes onde foi aplicado um cimento resinoso convencional (Variolink; Ivoclar Vivadent), observou-se formação de longos *tags* de resina no interior dos túbulos dentinários, associado à intensa inflamação e desorganização do tecido pulpar subjacente. Esta reação inflamatória foi persistente até 60 dias após a realização dos procedimentos clínicos.

Contudo, os resultados de um determinado agente cimentante não pode ser extrapolado para todos os materiais que se encontram na mesma categoria. Assim, pesquisas laboratoriais e clínicas devem ser conduzidas para avaliar as propriedades biológicas dos variados materiais dentários disponíveis no mercado, os quais, mesmo sem apresentar comprovada biocompatibilidade com o complexo dentina-polpa, têm sido amplamente usados para cimentação de restaurações indiretas^{3,38}. Contudo, após cuidadosa revisão da literatura contemporânea, não foi possível encontrar evidências científicas que demonstrem que a DB possa ser usada, com segurança, para substituir a DH em testes de citotoxicidade transdentinária de novos materiais odontológicos e/ou técnicas restauradoras. Assim, a possibilidade de empregar a DB como substituta da DH em testes de citotoxicidade, poderá não apenas facilitar a realização dos estudos *in vitro*, mas também permitirá avaliar e comparar o possível efeito transdentinário de um grande número de materiais dentários e seus protocolos de aplicação. Consequentemente, a magnitude dos dados científicos a serem obtidos com o emprego de discos de DB em testes biológicos poderá contribuir para a

evolução e a conseqüente inovação no campo da ciência direcionada ao desenvolvimento de materiais dentários biocompatíveis, prevenindo, ou pelo menos reduzindo os riscos de efeitos adversos para o complexo dentina-polpa.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias usadas na presente pesquisa, e considerando os resultados obtidos neste estudo laboratorial, é possível concluir que:

1. A dentina bovina é uma potencial alternativa para substituir dentina humana em testes *in vitro* de citotoxicidade transdentinária de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas.
2. Apenas o cimento resinoso autoadesivo RelyX U200 não se mostrou citotóxico para as células odontoblastóides MDPC-23.
3. Apenas o cimento de ionômero de vidro modificado por resina RelyX Luting 2 se mostrou citotóxico para as células da polpa dental humana HDPCs.

REFERÊNCIAS*

1. Hume WR. A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. *J Dent Res.* 1985; 64: 1322–5.
2. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J Oral Rehabil.* 1994; 21: 475–87.
3. de 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.
4. Hanks CT, Fat JC, Wataha JC, Corcoran JF. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials in vitro. *J Dent Res.* 1993; 72: 931–8.
5. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(6): 533-43.
6. Soares DG, Brito CA, Tavares da Silva RH, Ribeiro AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytocompatibility of HEMA-free resin-based luting cements according to application protocols on dentine surfaces. *Int Endod J.* 2016; 49(6): 551-60.
7. de Souza Costa CA. Biological aspects of dental materials. *J Adhes Dent.* 2020; 22(5): 540-4.
8. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *Int Endod J.* 1988; 21: 143–54.
9. Galler K, Hiller K, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod.* 2005; 31: 396–9.
10. Franz A, Lettner S, Watts DC, Graf A, Moritz A, Schedle A. Analysis of pre-test failures and bond-strengths of seven adhesive systems to bovine dentine: A nine-year novice/beginner operator study. *Dent Mater.* 2018; 34(11): 1599-609.
11. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Briso A, Ortecho-Zuta U, de Oliveira Ribeiro RA, Hebling J, et al. Influence of tooth pigmentation on H₂O₂ diffusion and its cytotoxicity after in-office tooth bleaching. *Oper Dent.* 2020; 45(6): 632-42.
12. Horsophonphong S, Sercia A, França CM, Tahayeri A, Reddy AP, Wilmarth PA, et al. Equivalence of human and bovine dentin matrix molecules for dental pulp regeneration: proteomic analysis and biological function. *Arch Oral Biol.* 2020; 119: 104888.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Enrich-Essvein T, Benavides-Reyes C, Álvarez-Lloret P, Bolaños-Carmona MV, Rodríguez-Navarro AB, González-López S. Influence of demineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clin Oral Investig*. 2021; 25(3): 841-9.
14. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil*. 2008; 35(5): 390-4.
15. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000; 45: 355-61.
16. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod*. 2007; 33: 422–6.
17. Teruel JD, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol*. 2015; 60: 768–75.
18. Soares LE, Santo AM. Morphological and chemical comparative analysis of the human and bovine dentin-adhesive layer. *Microsc Microanal*. 2015; 21(1): 204-13.
19. Lopes MB, Yan Z, Consani S, Gonini Júnior A, Aleixo A, McCabe JF. Evaluation of the coefficient of thermal expansion of human and bovine dentin by thermomechanical analysis. *Braz Dent J*. 2012; 23(1): 3-7.
20. Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SRP. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine and porcine teeth. *J Adhes Dent*. 2004; 6(2): 117-21.
21. Soares FZM, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta- analysis of in vitro studies. *Dent Mater*. 2016; 32(11): 1385-93.
22. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. *Caries Res*. 2003; 37(5): 339-44.
23. Novais VR, Soares PB, Guimarães CM, Schliebe LR, Braga SS, Soares CJ. Effect of gamma radiation and endodontic treatment on mechanical properties of human and bovine root dentin. *J Dent Braz*. 2016; 27(6): 670-4.
24. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LI, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod*. 2001; 27(1): 23-30.

25. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of enamel/dentin thickness on the toxic and esthetic effects of experimental in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(8): 2509-20.
26. Manso AP, Carvalho RM. Dental Cements for luting and bonding restorations: self-adhesive resin cements. *Dent Clin North Am*. 2017; 61(4): 821-34.
27. Hill EE. Dental cements for definitive luting: a review and practical clinical considerations. *Dent Clin North Am*. 2007; 51(3): 643-58.
28. Pegoraro TA, da Silva NR, Carvalho RM. Cements for use in esthetic dentistry. *Dent Clin North Am*. 2007; 51(2): 453-71.
29. Forsten L. Fluoride release from a glass ionomer cement. *Scand J Dent Res*. 1977; 85(6): 503-4.
30. Xie D, Brantley BM, Culbertson G, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2000; 16: 129-38.
31. Mitra SB, Lee CY, Bui HT, Tantbirojn D, Rusin RP. Long-term adhesion and mechanism of bonding of a paste-liquid resin-modified glass-ionomer. *Dent Mater*. 2009; 25: 459-66.
32. de Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K, Lambrechts P. Four-year water degradation of a resin modified glass-ionomer adhesive bonded to dentin. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112(1): 73-83.
33. Inoue S, Abe Y, Yoshida Y, de Munck J, Sano H, Suzuki K, et al. Effects of conditioner on bond strength of glass-ionomer adhesive to dentin/enamel with and without smear layer interposition. *Oper Dent*. 2004; 29(6): 685-92.
34. Bezzon OL, Rivera DS, Silva RA, Oliveira DS, Silva-Herzog D, Nelson-Filho P, et al. Resin luting materials: tissue response in dog's teeth. *Microsc Res Tech*. 2015; 78(12): 1098-103.
35. De Munck J, Vargas M, Van Landuyt K, Hikita K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bonding of an auto-adhesive luting material to enamel and dentin. *Dent Mater*. 2004; 20(10): 963-71.
36. Monticelli F, Osorio R, Mazzitelli C, Ferrari M, Toledano M. Limited decalcification/diffusion of self-adhesive cements into dentin. *J Dent Res*. 2008; 87(10): 974-9.
37. Sun F, Liu Y, Pan Y, Chen M, Meng X. Cytotoxicity of self-adhesive resin cements on human periodontal ligament fibroblasts. *Biomed Res Int*. 2018; 29: 2018: 7823467.
38. de 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.

39. da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes EC, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(7): 1559-66.
40. Leite ML, Soares DG, de Oliveira Duque CC, Bordini EAF, Anovazzi G, Basso FG, et al. Positive influence of simvastatin used as adjuvant agent for cavity lining. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(9): 3457-69.
41. Featherstone JD, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res*. 1981; 15(1): 109-14.
42. Popowics TE, Rensberger JM, Herring SW. The fracture behavior of human and pig molar cusps. *Arch Oral Biol*. 2001; 46(1): 1-12.
43. Lopes FM, Markarian RA, Sendyk CL, Duarte CP, Arana-Chavez VE. Suine teeth as potential substitutes for in vitro studies in tooth adhesion: a SEM observation. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(7): 548-51.
44. Ortiz-Ruiz AJ, Teruel-Fernández JD, Alcolea-Rubio LA, Hernández-Fernández A, Martínez-Beneyto Y, Gispert-Guirado F. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. *Ann Anat*. 2018; 218: 7-17.
45. Patierno JM, Rueggeberg FA, Anderson RW, Weller RN, Pashley DH. Push-out strength and SEM evaluation of resin composite bonded to internal cervical dentin. *Endod Dent Traumatol*. 1996; 12(5): 227-36.
46. Zanchi CH, Münchow EA, Ogliari FA, Chersoni S, Prati C, Demarco FF, et al. Development of experimental HEMA-free three-step adhesive system. *J Dent*. 2010; 38(6): 503-8.
47. Pucci CR, de Oliveira RS, Caneppele TM, Torres CR, Borges AB, Tay FR. Effects of surface treatment, hydration and application method on the bond strength of a silorane adhesive and resin system to dentine. *J Dent*. 2013; 41(3): 278-86.
48. Bouillaguet S, Troesch S, Wataha JC, Krejci I, Meyer JM, Pashley DH. Microtensile bond strength between adhesive cements and root canal dentin. *Dent Mater*. 2003; 19(3): 199-205.
49. Gaston BA, West LA, Liewehr FR, Fernandes C, Pashley DH. Evaluation of regional bond strength of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod*. 2001; 27(5): 321-4.
50. Mitsui FH, Marchi GM, Pimenta LA, Ferraresi PM. In vitro study of fracture resistance of bovine roots using different intraradicular post systems. *Quintessence Int*. 2004; 35(8): 612-6.
51. Reeves GW, Fitchie JG, Hembree JH Jr, Puckett AD. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. *Oper Dent*. 1995; 20(6): 230-5.

52. Galhano G, de Melo RM, Valandro LF, Bottino MA. Comparison of resin push-out strength to root dentin of bovine- and human -teeth. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(3): 332-6.
53. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci.* 2011; 53(3): 273-82.
54. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GA, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(11): 919-22.
55. Lopes MB, Sinhoreti MA, Correr Sobrinho L, Consani S. Comparative study of the dental substrate used in shear bond strength tests. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17(2): 171-5.
56. Rüttermann S, Braun A, Janda R. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *PLoS One.* 2013; 8(3): e59181.
57. Krifka S, Börzsönyi A, Koch A, Hiller KA, Schmalz G, Friedl KH. Bond strength of adhesive systems to dentin and enamel human vs. bovine primary teeth *in vitro*. *Dent Mater.* 2008; 24(7): 888-94.
58. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. *Caries Res.* 2011; 45(5): 429-34.
59. Yavuz I, Tumen EC, Kaya CA, Dogan MS, Gunay A, Unal M, et al. The reliability of microleakage studies using dog and bovine primary teeth instead of human primary teeth. *Eur J Paediatr Dent.* 2013; 14(1): 42-6.
60. de Carvalho MFF, Leijôto-Lannes ACN, Rodrigues MCN, Nogueira LC, Ferraz NKL, Moreira AN, et al. Viability of bovine teeth as a substrate in bond strength tests: a systematic review and meta-analysis. *J Adhes Dent.* 2018; 20(6): 471-9.
61. Silva EJNL, Carvalho NK, Prado MC, Senna PM, Souza EM, De-Deus G. Bovine teeth can reliably substitute human dentine in an intra-tooth push-out bond strength model? *Int Endod J.* 2019; 52(7): 1063-9.
62. Moda MD, Fagundes TC, Bresciani E, Briso ALF, Dos Santos PH. Comparison of in vitro erosion protocols in bovine teeth to simulate natural erosion lesion: analysis of mechanical properties and surface gloss. *J Appl Oral Sci.* 2019; 7: 27: e20180107.
63. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J.* 2009; 20(4): 267-74.
64. da Silva JM, Rodrigues JR, Camargo CH, Fernandes VV Jr, Hiller KA, Schweikl H, et al. Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(2): 607-13.

65. Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Attin T, Belibasakis GN. Influence of light-curing mode on the cytotoxicity of resin-based surface sealants. *BMC Oral Health*. 2014; 6: 14-48.
66. Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(9): 1428-36.
67. de Almeida LC, Soares DG, Azevedo FA, Gallinari Mde O, Costa CA, dos Santos PH, et al. At-home bleaching: color alteration, hydrogen peroxide diffusion and cytotoxicity. *Braz Dent J*. 2015; 26(4): 378-83.
68. de Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, de Souza Costa CA, Dos Santos PH, Briso AL. Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(3): 673-80.
69. Jiang RD, Lin H, Zheng G, Zhang XM, Du Q, Yang M. *In vitro* dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *J Dent*. 2017; 58: 28-33.
70. Caldas IP, Alves GG, Barbosa IB, Scelza P, de Noronha F, Scelza MZ. *In vitro* cytotoxicity of dental adhesives: a systematic review. *Dent Mater*. 2019; 35(2): 195-205.
71. Walcher JG, Leitune VCB, Collares FM, de Souza Balbinot G, Samuel SMW. Physical and mechanical properties of dual functional cements-an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(4): 1715-21.
72. Pupo YM, Bernardo CFF, de Souza FFFA, Michél MD, Ribeiro CNM, Germano S, et al. Cytotoxicity of etch-and-rinse, self-etch, and universal dental adhesive systems in fibroblast cell line 3T3. *Scanning*. 2017; 10: 2017:9650420.
73. de Souza Costa CA, do 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.
74. Schmid-Schwap M, Franz A, König F, Bristela M, Lucas T, Piehslinger E, et al. Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater*. 2009; 25(3): 360-8.
75. D'Alpino PHP, Moura GEDD, Barbosa SCA, Marques LA, Eberlin MN, Nascimento FD, et al. Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol. *Dent Mater*. 2017; 33(12): 1402-15.
76. Burke FJ. Trends in indirect dentistry: 3. Luting materials. *Dent Update*. 2005; 32(5): 251-4, 257-8, 260.
77. Piwowarczyk A, Bender R, Ottl P, Lauer HC. Long-term bond between dual-polymerizing cementing agents and human hard dental tissue. *Dent Mater*. 2007; 23(2): 211-7.

78. Arslan Malkoç M, Demir N, Şengün A, Bozkurt ŞB, Hakki SS. Cytotoxicity evaluation of luting resin cements on bovine dental pulp-derived cells (bDPCs) by real-time cell analysis. *Dent Mater J.* 2015; 34(2): 154-60.
79. Carrillo-Cotto R, Etges A, Jardim PS, Torre E, Kaizer MR, Ferrúa CP, et al. Cytotoxicity of contemporary resin-based dental materials in contact with dentin. *Eur J Oral Sci.* 2020; 128(5): 436-43.
80. Ladha K, Verma M. Conventional and contemporary luting cements: an overview. *J Indian Prosthodont Soc.* 2010; 10(2): 79-88.
81. Kraus D, Wolfgarten M, Enkling N, Helfgen EH, Frentzen M, Probstmeier R, et al. In-vitro cytocompatibility of dental resin monomers on osteoblast-like cells. *J Dent.* 2017; 65: 76-82.
82. Ülker HE, Hiller KA, Schweikl H, Seidenader C, Sengun A, Schmalz G. Human and bovine pulp-derived cell reactions to dental resin cements. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(6): 1571-8.
83. Lovász BV, Berta G, Lempel E, Sétáló G Jr., Vecsernyés M, Szalma J. TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate) induces both caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathways in pulp cells. *Polymers.* 2021; 13(5): 699.
84. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1997; 15:37(4): 517-24.
85. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41(3): 474-80.
86. Pagano S, Coniglio M, Valenti C, Negri P, Lombardo G, Costanzi E, et al. Biological effects of resin monomers on oral cell populations: descriptive analysis of literature. *Eur J Paediatr Dent.* 2019; 20(3): 224-32.
87. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater.* 2009; 25(1): 39-47.
88. Lad PP, Kamath M, Tarale K, Kusugal PB. Practical clinical considerations of luting cements: a review. *J Int Oral Health.* 2014; 6(1): 116-20.
89. Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol.* 1982; 11(6): 439-50.
90. Kamposiora P, Papavasiliou G, Bayne SC, Felton DA. Finite element analysis estimates of cement microfracture under complete veneer crowns. *J Prosthet Dent.* 1994; 71(5): 435-41.

91. Rosenstiel SF, Land MF, Crispin BJ. Dental luting agents: a review of the current literature. *J Prosthet Dent.* 1998; 80(3): 280-301.
92. Ulker HE, Sengun A. Cytotoxicity evaluation of self-adhesive composite resin cements by dentin barrier test on 3D pulp cells. *Eur J Dent.* 2009; 3(2): 120-6.
93. Seelbach P, Finger WJ, Ferger P, Balkenhol M. Temperature rise on dentin caused by temporary crown and fixed partial denture materials: influencing factors. *J Dent.* 2010; 38(12): 964-73.
94. Wilson AD. Alumino-silicate polyacrylic acid and related cements. *Br Polym J.* 1974; 6: 165-79.
95. Anusavice KJ. Phillips' science of dental materials, 11th ed. St Louis: Saunders, 2003. p. 443, 486-9.
96. Ching HS, Luddin N, Kannan TP, Ab Rahman I, Abdul Ghani NRN. Modification of glass ionomer cements on their physical-mechanical and antimicrobial properties. *J Esthet Restor Dent.* 2018; 30(6): 557-71.
97. Ersahan S, Oktay EA, Sabuncuoglu FA, Karaoglanoglu S, Aydın N, Suloglu AK. Evaluation of the cytotoxicity of contemporary glass-ionomer cements on mouse fibroblasts and human dental pulp cells. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2020; 21(3): 321-8.
98. Tavangar MS, Jafarpur D, Bagheri R. Evaluation of compressive strength and sorption/solubility of four futing cements. *J Dent Biomater.* 2017; 4(2): 387-93.
99. Trumpaite-Vanagiene R, Bukelskiene V, Aleksejuniene J, Puriene A, Baltrikiene D, Rutkunas V. Cytotoxicity of commonly used luting cements a-An *in vitro* study. *Dent Mater J.* 2015; 34(3): 294-301.
100. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999; 48(3): 277-88.
101. de Lima E, Santos R, Durão M, Nascimento A, Braz R. Universal cements: dual activated and chemically activated. *Acta Biomater Odontol Scand.* 2016; 23;2(1): 125-9.
102. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16(3): 265-73.
103. Trajtenberg CP, Caram SJ, Kiat-amnuay S. Microleakage of all-ceramic crowns using self-etching resin luting agents. *Oper Dent.* 2008; 33(4):392-9.
104. Ferracane JL, Stansbury JW, Burke FJ. Self-adhesive resin cements - chemistry, properties and clinical considerations. *J Oral Rehabil.* 2011; 38(4): 295-314.

105. Hikita K, Van Meerbeek B, De Munck J, Ikeda T, Van Landuyt K, Maida T, et al. Bonding effectiveness of adhesive luting agents to enamel and dentin. *Dent Mater*. 2007; 23(1): 71-80.
106. Soares DG, Ribeiro AP, da Silveira Vargas F, Hebling J, de Souza Costa CA. Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(8): 1901-9.
107. Leite MLAS, de Souza Costa CA, Duarte RM, Andrade AKM, Soares DG. Bond strength and cytotoxicity of a universal adhesive according to the hybridization strategies to dentin. *Braz Dent J*. 2018; 29(1): 68-75.
108. Souza IR, Pansani TN, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytotoxicity of acrylic resin-based materials used to fabricate interim crowns. *J Prosthet Dent*. 2020; 124(1): 122.e1-9.
109. Bianchi L, Ribeiro AP, Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101(8): 1498-507.
110. International Organization for Standardization. ISO 10993-12, Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials. Geneva: ISO; 2012.
111. Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Silva Leite MLA, Basso FG, et al. Biological analysis of simvastatin-releasing chitosan scaffold as a cell-free system for pulp-dentin regeneration. *J Endod*. 2018; 44(6): 971-6.
112. Soares DG, Gonçalves Basso F, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of hydrogen-peroxide-mediated oxidative stress on human dental pulp cells. *J Dent*. 2015; 43(6): 750-6.
113. 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; 21(9): 2827-39.
114. Laurance-Young P, Bozec L, Gracia L, Rees G, Lippert F, Lynch RJM, et al. A review of the structure of human and bovine dental hard tissues and their physicochemical behavior in relation to erosive challenge and remineralization. *J Dent*. 2011; 39(4): 266-72.
115. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, Soares CJ, Sinhoreti MA, Puppini-Rontani RM, et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol*. 2008; 53(11): 1023-9.
116. Tay FR, Pang KM, Gwinnett AJ, Wei SHY. Scanning electron microscopic study of the extent of resin penetration into human coronal dentin following a total etch technique in vivo. *Cells Mater* 1994; 4: 317-29.

117. de 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.
118. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2009; 31: 672(2): 103-12.
119. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5): 679-728.
120. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011; 1; 3: 711-35.
121. de 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.
122. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, et al. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res.* 2004; 83(11): 843-8.
123. de Souza Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater.* 2011; 27(7): e158-70.
124. Soares DG, Basso FG, Scheffel DL, Giro EM, de Souza Costa CA, Hebling J. Biocompatibility of a restorative resin-modified glass ionomer cement applied in very deep cavities prepared in human teeth. *Gen Dent.* 2016; 64(4): 33-40.
125. Ribeiro APD, Sacono NT, Soares DG, Bordini EAF, de Souza Costa CA, Hebling J. Human pulp response to conventional and resin-modified glass ionomer cements applied in very deep cavities. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(5): 1739-48.
126. Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M, Gotoh M, et al. Effects of extracellular pH on dental pulp cells in vitro. *J Endod.* 2016; 42(5): 735-41.
127. Trevani AS, Andonegui G, Giordano M, López DH, Gamberale R, Minucci F, et al. Extracellular acidification induces human neutrophil activation. *J Immunol.* 1999; 162(8): 4849-57.
128. Rajamäki K, Nordström T, Nurmi K, Åkerman KE, Kovanen PT, Öörni K, et al. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem.* 2013; 288(19): 13410-9.
129. Lucas CA, Gillies RJ, Olson JE, Giuliano KA, Martinez R, Sneider JM. Intracellular acidification inhibits the proliferative response in BALB/c-3T3 cells. *J Cell Physiol.* 1988; 136(1): 161-7.

130. Marches R, Vitetta ES, Uhr JW. A role for intracellular pH in membrane IgM-mediated cell death of human B lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(6): 3434-9.
131. de Mendonça AA, Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 104(4): e102-8.
132. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15(1): 13-27
133. Murray PE, Windsor LJ, Smyth TW, Hafez AA, Cox CF. Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(6): 509-20.
134. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells. *Dent Mater*. 2012; 28(3): 327-39.
135. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells. *Int Endod J*. 2016; 49(1): 26-36.
136. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 1: 66(3): 476-82.
137. Chang MC, Lin LD, Chan CP, Chang HH, Chen LI, Lin HJ, et al. The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE2 production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and -independent pathways. *Biomaterials*. 2009; 30(25): 4070-7.
138. Chang MC, Chen LI, Chan CP, Lee JJ, Wang TM, Yang TT, et al. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*. 2010; 31(32): 8164-71.
139. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006; 85(10): 870-7.
140. Pontes EC, Soares DG, Hebling J, Costa CA. Cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Am J Dent*. 2014; 27(5): 237-44.
141. Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil*. 2008; 35(12): 940-6.

142. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater.* 2002; 18(4): 318-23.
143. Susila AV, Balasubramanian V. Correlation of elution and sensitivity of cell lines to dental composites. *Dent Mater.* 2016; 32(3): e63-72.
144. Diemer F, Stark H, Helfgen EH, Enkling N, Probstmeier R, Winter J, et al. In vitro cytotoxicity of different dental resin-cements on human cell lines. *J Mater Sci Mater Med.* 2021; 20; 32(1): 4.
145. Walther UI, Wilhelm B, Walther SC, Mückter H, Forth W. Effect of zinc chloride on GSH synthesis rates in various lung cell lines. *In Vitro Mol Toxicol.* 2000; 13(2): 145-52.
146. Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(2): 125-31.
147. Reichl FX, Walther UI, Durner J, Kehe K, Hickel R, Kunzelmann KH, et al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dent Mater.* 2001; 17(2): 95-101.
148. Van Landuyt KL, Krifka S, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Van Meerbeek B, et al. Evaluation of cell responses toward adhesives with different photoinitiating systems. *Dent Mater.* 2015; 31(8): 916-27.
149. Catunda RQ, Vieira JR, de Oliveira EB, da Silva EC, Brasil VL, Perez DC. Cytotoxicity evaluation of three dental adhesives on vero cells in vitro. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(1): e61-6.
150. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials.* 2007; 28(26): 3757-85.
151. Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. *Arch Oral Biol.* 2001; 46(5): 391-401.