



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.

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 **Taís 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 padronizadas 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 consequente 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.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste estudo foi avaliar se a DB pode ser usada para substituir a DH em testes biológicos de citotoxicidade indireta, bem como determinar, por meio do emprego de modelo experimental *in vitro* que mimetiza condições clínicas, a citotoxicidade transdentinária de diferentes materiais resinosos usados para cimentação de peças protéticas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar se a dentina de dentes bovinos pode ser uma alternativa adequada para substituir a DH quando da realização de testes de citotoxicidade transdentinária de materiais utilizados para cimentação de peças protéticas.
2. Determinar e comparar a citotoxicidade transdentinária de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas sobre células odontoblastóides MDPC-23;
3. Determinar e comparar a citotoxicidade de extratos obtidos de materiais resinosos utilizados para cimentação de peças protéticas sobre células MDPC-23 e células isoladas da polpa dental humana (HDPCs);

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Substrato Dentinário Humano e Bovino

A maioria dos estudos *in vitro* que avaliaram diferentes propriedades de materiais dentários, utilizaram dentes humanos extraídos ou amostras obtidas a partir deles^{5,17,39,40}. Entretanto, questões éticas relacionadas ao uso de dentes humanos em pesquisa, bem como a dificuldade para se obter a quantidade de dentes suficiente para executar projetos qualificados e de relevância científica, tem incentivado a busca por substratos alternativos, como àqueles provenientes de dentes bovinos, suínos e ovinos^{10-12,17,21,41-44}.

Os dentes bovinos têm sido os mais utilizados para substituir dentes humanos em estudos *in vitro* realizados dentro da área odontológica^{11,17,25,45-47}, principalmente em testes de resistência à microtração²⁰, microcisalhamento^{48,49}, resistência à fratura⁵⁰ e testes de microinfiltração⁵¹. Além de amplamente disponíveis, dentes bovinos também têm sido frequentemente empregados para substituir dentes humanos em pesquisas laboratoriais devido a facilidade de se padronizar as amostras, o que limita a possibilidade desta questão metodológica interferir nos resultados a serem obtidos⁵².

Os principais fatores a serem levados em consideração ao analisar os possíveis substitutos para os dentes humanos em estudos laboratoriais, são as características físico-químicas, estruturais e biológicas dos dentes de outras espécies, as quais devem ser semelhantes aos dentes humanos^{17,21,43,53}. Quanto maior a semelhança entre os substratos, mais seguros e confiáveis serão os resultados obtidos⁵⁴. Num estudo realizado há duas décadas por Schilke et al.¹⁵ (2000), os autores demonstraram que não há diferença significativa quanto ao diâmetro e número dos túbulos dentinários, por mm² de área, nas camadas de dentina coronária de primeiros e segundos molares decíduos e terceiros molares humanos em comparação à incisivos centrais bovinos. Mais recentemente, Camargo et al.¹⁶ (2007) avaliaram a quantidade e o diâmetro dos túbulos dentinários nos terços cervical, médio e apical dos canais radiculares de pré-molares humanos e incisivos bovinos. Foi demonstrado que apesar dos espécimes de DB apresentarem quantidade média de túbulos dentinários significativamente maior em comparação a DH, esse substrato permeável é semelhante quanto ao diâmetro dos túbulos. Além disso, dentes

humanos e bovinos exibem semelhança quanto a composição química¹⁶, bem como com relação ao conteúdo de cálcio e fósforo (% em peso)¹⁸.

Diversos estudos também compararam dentes bovinos e humanos quanto a resistência de união⁵⁵, radiodensidade⁵⁴ e resistência ao cisalhamento⁵⁶. Num estudo realizado por Schmalz et al.²⁴ (2001), a condutância hidráulica e o fluxo difusional de água foram comparados na dentina obtida de dentes humanos e bovinos. Os autores relataram que a DB próxima à junção cimento-esmalte apresenta comportamento semelhante à DH, o que indica que este modelo animal pode ser uma alternativa adequada para o desenvolvimento de estudos laboratoriais. Lopes et al.⁵⁵ (2003) demonstraram que a resistência de união de sistemas adesivos em esmalte não diferiu entre dentes humanos e bovinos. Porém, dependendo do tipo de sistema adesivo usado, os resultados obtidos em DH diferiram da DB.

Reis et al.²⁰ (2004) compararam a resistência de união de um sistema adesivo aplicado em esmalte e dentina de dentes humanos, bovinos e suínos, bem como analisaram a morfologia destes substratos em microscópio eletrônico de varredura. Não foi observado diferença estatística entre os tecidos no teste de resistência de união; contudo, o esmalte suíno apresentou distribuição de prismas de esmalte diferente do esmalte humano e bovino. Assim, os autores concluíram que os dentes bovinos são melhores substitutos que os dentes suínos para testes que avaliam a capacidade de adesão de sistemas adesivos. Neste mesmo ano, Fonseca et al.⁵⁴ (2004) compararam a radiodensidade do esmalte e dentina de dentes humanos, bovinos e suínos, sendo que os resultados demonstram que ambos os tecidos de bovinos são mais semelhantes aos de dentes humanos.

Krifka et al.⁵⁷ (2008) avaliaram a interação de cimentos adesivos com a dentina e esmalte de dentes humanos e bovinos. Os autores demonstraram que esses tecidos mineralizados do dente bovino têm potencial para substituir àqueles de origem humana, particularmente para testes de resistência adesiva.

Na última década, uma ampla revisão de literatura envolvendo estudos *in vitro* e *in vivo*, analisou o possível uso de dentes bovinos como substitutos de dentes humanos em pesquisas no campo da Odontologia⁵³. Nesta revisão, os autores observaram os seguintes parâmetros: morfologia dentária, composição química, propriedades físicas, desenvolvimento de lesão de cárie dentária em esmalte e dentina, desenvolvimento e progressão de erosão/abrasão dentária, capacidade de

adesão/resistência adesiva, bem como microinfiltração marginal. Ao final, concluiu-se que os dados analisados eram inconsistentes para afirmar que os dentes bovinos podem ser utilizados como substitutos para dentes humanos quando da realização de pesquisas envolvendo materiais odontológicos. Ainda nesse mesmo ano, Kato et al.⁵⁸ (2011) compararam a atividade de metaloproteinases tipo 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) em DB e DH. Os autores mostraram que a atividade da MMP-2 foi maior na DH, enquanto não houve diferença estatística na atividade da MMP-9 em ambos os substratos testados.

Em outro estudo, Lopes et al.¹⁹ (2012) demonstraram que o coeficiente de expansão térmica de dentes humanos e bovinos é estatisticamente semelhante. Rüttermann et al.⁵⁶ (2013) avaliaram se o esmalte e a DB são substitutos adequados aos dentes humanos em teste de resistência ao cisalhamento e análise de fratura de diferentes sistemas adesivos. Os autores relataram que apesar dos tecidos apresentarem resultados diferentes quanto a resistência ao cisalhamento, a análise de fratura foi semelhante para ambos os materiais resinosos. Yavuz et al.⁵⁹ (2013) compararam a qualidade de restaurações de classe V, utilizando para isso uma resina composta modificada por poliácidos (F 2000 Compomer, 3M, EUA), a qual foi aplicada em dentes humanos, caninos e bovinos. Os autores mostraram que não houve diferença na qualidade das restaurações após termociclagem das amostras, afirmando que todos os substratos testados são adequados para realizar esse tipo de teste.

Em 2015, Soares e Santo¹⁸ avaliaram, em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS), a morfologia e composição química, respectivamente, da dentina de dentes humanos e bovinos antes e após a aplicação de diferentes sistemas adesivos. Neste mesmo ano, Teruel et al.¹⁷ (2015) analisaram a composição química do esmalte e dentina de dentes humanos, comparando-a com as de outras espécies de mamíferos. Em ambos os estudos, os pesquisadores concluíram que a composição química da DH e DB é semelhante.

Outra revisão sistemática comparou valores de resistência de união de diferentes tipos de adesivos dentinários (convencional e autocondicionante) aplicados sobre os tecidos mineralizados de dentes humanos e bovinos²¹. Os autores relataram que, a substituição de dentes humanos por dentes bovinos em testes de resistência de união à dentina e esmalte, produz resultados semelhantes.

De Carvalho et al.⁶⁰ (2018) analisaram, por meio de revisão sistemática com meta-análise, a resistência à tração e cisalhamento de diferentes materiais (sistema adesivo, produtos para cimentação de peças protéticas e ionômero de vidro) aplicados sobre dentes humanos e bovinos. Os autores concluíram que o dente bovino é uma alternativa viável para substituir os dentes humanos decíduos e permanentes em testes de resistência ao cisalhamento. Entretanto, para os testes de resistência à tração em esmalte, mais estudos devem ser conduzidos, visto que os dados disponíveis eram heterogêneos. Mais recentemente, Silva et al.⁶¹ (2019) investigaram a possibilidade de utilizar dentes bovinos para substituir dentes humanos em testes de resistência de união à dentina de cimentos endodônticos. Nesse estudo, os autores relataram que a origem do tecido dentinário (bovina ou humana) não interferiu na resistência de união dos materiais testados.

Mesmo considerando os importantes dados científicos obtidos até o momento, muitos pesquisadores seguem avaliando e comparando as propriedades e resultados de investigações desenvolvidas com dentes humanos e dentes de diferentes mamíferos. Alguns dos estudos mais recentes demonstraram a viabilidade de utilizar dentes de alguns animais como substitutos aos humanos para realizar protocolos laboratoriais específicos^{61,62}. Todavia, os pesquisadores ainda se questionam se dentes bovinos também podem ser usados, com segurança, para substituir dentes humanos em testes biológicos *in vitro*, tais como àqueles relacionados com a avaliação da citotoxicidade trans-amelodentinária de materiais dentários e novas técnicas de aplicação clínica. Apesar da DB ter sido amplamente empregada na última década para avaliar comparativamente a citotoxicidade indireta de materiais dentários^{11,25,63-68}, este modelo experimental ainda gera controvérsia e parece exigir análises comparativas mais objetivas e detalhadas^{25,68}.

Os ensaios que utilizam barreira dentinária (testes indiretos) foram desenvolvidos para analisar e comparar a citotoxicidade de materiais dentários, especialmente aqueles recomendados para aplicação direta sobre este substrato tubular permeável^{3,7,69}. O objetivo principal deste tipo de protocolo laboratorial tem sido obter dados científicos *in vitro* mais próximos de situações clínicas, e consequentemente mais relevantes e significativos para a Odontologia^{3,7}. De acordo com Jiang et al.⁶⁹ (2017), o modelo que utiliza a barreira dentinária mimetiza a prática clínica e fornece resultados que refletem, com mais precisão, a resposta de células a

alguns procedimentos clínicos, tais como o condicionamento ácido e aplicação de sistema adesivo, bem como o efeito da fotobiomodulação na dentina.

Barreiras dentinárias de variadas espessuras, obtidas de dentes humanos e adaptadas em diferentes modelos de câmara pulpar artificial (CPAs), têm sido usadas com sucesso para avaliar a citotoxicidade indireta de materiais dentários, tais como forradores cavitários, cimentos resinosos ou não, sistemas adesivos e outros^{3,7}. Nesse modelo de pesquisa *in vitro*, discos de dentina são obtidos, selecionados e padronizados de acordo com o objetivo do estudo, permitindo a utilização de amostras mais delgadas ou espessas, as quais permitem simular cavidades de diferentes profundidades⁶⁹. Os discos de dentina são inseridos nas CPAs de tal maneira que sua superfície pulpar seja mantida em contato com o meio de cultura (parte inferior), enquanto a superfície oclusal permanece exposta (parte superior) para receber os materiais dentários e/ou as terapias experimentais^{3,7}. A principal vantagem deste protocolo *in vitro*, onde discos de dentina são usados como barreiras biológicas naturais, é a possibilidade de padronizar as amostras quanto a espessura e permeabilidade, o que está diretamente relacionado com a intensidade da difusão de componentes tóxicos dos materiais via túbulos dentinários⁶⁹. Consequentemente, a padronização dos discos de dentina é imprescindível para que este método produza resultados consistentes, confiáveis e reproduzíveis^{3,7,69}.

3.2 Materiais Resinosos Utilizados para Cimentação de Peças Protéticas

O aumento da demanda por estética e restaurações dentárias minimamente invasivas, levou a rápida evolução das pesquisas relacionadas com a análise das propriedades físicas e mecânicas de materiais usados na Odontologia^{70,71}, o que resultou no desenvolvimento de uma grande variedade de produtos ainda disponíveis no mercado⁷². Diante desta tendência, os testes de citotoxicidade de materiais dentários, os quais seguiam normas rígidas e arcaicas pré-estabelecidas por Organizações e Instituições internacionais, passaram a evoluir por meio do emprego de protocolos *in vitro* que aproximavam condições laboratoriais de situações clínicas cotidianas⁷³.

Recentemente, uma grande variedade de novos cimentos resinosos foi introduzida no mercado, com amplas possibilidades de aplicações clínicas. Dessa forma, esses materiais podem ser expostos a diferentes tecidos, sendo que tal como

acontece com outros produtos utilizados na Odontologia, eles podem causar ou não reações adversas em células pulpares ou da mucosa bucal adjacente. Consequentemente, é indispensável que testes de citotoxicidade sejam realizados para determinar a segurança de uso clínico desses novos cimentos resinosos^{38,39,74,75}.

Materiais à base de resina têm sido utilizados para cimentação de peças protéticas, principalmente àquelas confeccionadas livre de metal⁷⁶, pois estes cimentos proporcionam adequada adesão das mesmas aos tecidos mineralizados do dente^{36,77}. No entanto, a limitada informação referente à biocompatibilidade destes materiais resinosos com o complexo dentina-polpa tem sido questionada nos últimos anos^{3,7,38}. Como as restaurações indiretas são mais frequentemente cimentadas em cavidades amplas, espera-se que maior difusão transdentinária de moléculas tóxicas liberadas dos materiais à base de resina ocorra, o que pode resultar em lesão irreversível das células pulpares^{3,38}. Tem sido relatado que a intensidade dos danos pulpares causados por materiais dentários resinosos depende da composição do material, do peso molecular (tamanho) e solubilidade dos monômeros presentes neles, bem como da espessura e permeabilidade da dentina remanescente entre o produto sintético usado e a polpa^{34,39,74,78,79}.

De maneira geral, os cimentos resinosos apresentam uma porção orgânica composta por monômeros resinosos e uma porção inorgânica caracterizada por partículas de sílica e quartzo de diferentes tamanhos, bem como silano (que promove a união das porções orgânica e inorgânica), pigmentos e sistema ativador e iniciador^{27,28,34,78,80}. Monômeros não convertidos no material resinoso podem lixiviar para alcançar os tecidos moles da cavidade oral ou para se difundir pelos túbulos dentinários, o que pode causar efeitos biológicos adversos, tais como reações alérgicas e/ou toxicidade pulpar, respectivamente^{34,78,81}.

A citotoxicidade dos materiais dentários resinosos tem sido diretamente relacionada com a quantidade e natureza dos componentes lixiviados deles^{5,78,79,81-83}. Segundo alguns pesquisadores, o monômero que apresenta o maior potencial citotóxico é o metacrilato de bisfenol A-glicidil (BisGMA), seguido pelo dimetacrilato de uretano (UDMA), dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) e metacrilato de 2-hidroxietil (HEMA)^{81,84,85}. Porém, com relação aos materiais que são recomendados para aplicação sobre dentina, a característica hidrófila/hidrófoba e o peso molecular desses monômeros podem influenciar a difusão deles através dos túbulos dentinários.

O peso molecular dos principais monômeros que estão presentes nos materiais dentários resinosos é: Bis-GMA - 513 g/mol; UDMA - 470 g/mol; TEGDMA - 286,36 g/mol; e HEMA - 130 g/mol. Desta forma, acredita-se que a propriedade hidrófila e o reduzido peso molecular do HEMA, sejam os principais fatores responsáveis pela rápida e intensa difusão transdentinária desse monômero quando materiais resinosos são aplicados em cavidades muito profundas^{38,39,86}. Por outro lado, apesar do elevado potencial citotóxico do Bis-GMA, o alto peso molecular e a característica hidrófoba desse monômero limitam sua solubilidade e difusão via túbulos dentinários^{75,81,86,87}.

De maneira geral, os agentes cimentantes têm como objetivo principal preencher a interface prótese/superfície dentária preparada, fornecendo vedamento marginal e conferindo resistência à restauração e ao remanescente dentário, aumentando a longevidade dos trabalhos protéticos^{27,88}. Além disso, esses materiais também devem atuar como isolante térmico, elétrico e químico e se possível apresentar efeitos antimicrobianos, bem como manter a função mastigatória e estética^{27,89-93}.

Dentre os diversos materiais dentários usados na clínica odontológica para cimentação de peças protéticas, estão os produtos à base de ionômero de vidro. Os cimentos de ionômero de vidro convencionais (CIVs), os quais foram desenvolvidos em 1969, são basicamente compostos por ácido poliacrílico e um pó de aluminossilicato de vidro⁹⁴⁻⁹⁶. Esses materiais ionoméricos são biocompatíveis, apresentam liberação de flúor, módulo de elasticidade semelhante ao da dentina e adesão à estrutura dentária^{29-31,96,97}. Devido à todas essas ótimas propriedades, os CIVs são populares na clínica odontológica, sendo amplamente empregados como materiais restauradores em odontopediatria, selantes de fissuras e materiais restauradores diretos no tratamento restaurador atraumático (ART). Apesar de suas vantagens, os CIVs têm algumas limitações, como elevada solubilidade e baixa resistência ao desgaste^{30,96-98}. Para compensar essas deficiências físicas e mecânicas, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs) foram desenvolvidos e introduzidos na Odontológica em 1991^{96,97}. Esses materiais contêm os mesmos componentes dos CIVs convencionais, porém foi adicionado a eles o HEMA^{96,99}. Apesar da presença do componente resinoso melhorar as propriedades mecânicas desses materiais ionoméricos, a biocompatibilidade deles pode ser decisivamente afetada por esta alteração de composição química^{96,97,100}.

Além dos CIVMRs, diversos cimentos resinosos convencionais e cimentos autoadesivos têm sido amplamente empregados para cimentação de restaurações indiretas^{27,28}. Cimentos resinosos contendo metacrilato de metila, dimetacrilato de Bis-GMA e/ou UDMA estão sendo clinicamente usados há algumas décadas²⁷. Esses materiais foram inicialmente classificados quanto ao método de polimerização e tipo de interação com o substrato dentário. Quanto ao método de polimerização, eles foram divididos em autopolimerizáveis, fotopolimerizáveis, e de dupla polimerização¹⁰¹. Quanto a interação com os tecidos mineralizados do dente, os cimentos resinosos foram divididos em convencionais (requerem prévio condicionamento ácido dos tecidos mineralizados do dente, autocondicionantes (cimentos resinosos adesivos), e autoadesivos^{34,82,102,103}.

Os cimentos resinosos convencionais requerem várias etapas clínicas⁸², uma vez que a adesão aos tecidos dentários é obtida pelo prévio condicionamento ácido e aplicação de um sistema adesivo sobre os substratos, os quais são executados em passos separados^{34,102}. Desta forma, a hibridização da dentina acontece antes do uso do cimento resinoso convencional para fixar a peça protética^{3,38}. Com o objetivo de melhorar a resistência de união dos cimentos resinosos aos tecidos dentários, monômeros fosforilados foram adicionados à formulação desses materiais, surgindo uma nova categoria de cimento resinoso, denominado de autocondicionante¹⁰³. Estes cimentos não requerem condicionamento ácido prévio da dentina, pois o kit desses produtos contém um primer acidificado que desmineraliza o substrato dentinário e permite a concomitante penetração dos monômeros, resultando na adesão destes produtos resinosos com os tecidos mineralizados do remanescente dentário^{34,103}. Os cimentos resinosos autoadesivos foram introduzidos na Odontologia com o objetivo de eliminar a necessidade de pré-tratamento ácido e aplicação de primers e/ou sistemas adesivos nas superfícies dentárias, permitindo que o material fosse usado em passo único³⁴. Para isso, monômeros multifuncionais com grupamentos acídicos foram incorporados ao cimento, fazendo com que sua adesão à estrutura dentária fosse alcançada empregando uma técnica simplificada, a qual consome pouco tempo clínico^{35-37,104}. Estes monômeros funcionais simultaneamente desmineralizam e se infiltram no esmalte e dentina com o objetivo de promover uma retenção micromecânica, enquanto formam uma ligação química com o substrato dentário³⁵⁻³⁷. Os monômeros acídicos presentes na composição dos cimentos autoadesivos são

geralmente mais fracos quando comparados com o ácido fosfórico. Portanto, esses cimentos apresentam limitado potencial de desmineralização e, conseqüentemente, gera forças de adesão mais fracas em comparação com as técnicas de hibridização convencionais, onde etapas individuais de desmineralização e aplicação do sistema adesivo são realizadas^{35,36,105}.

Diante dos dados científicos expostos até o momento, fica evidente que muitos estudos têm avaliado as propriedades físicas e mecânicas dos materiais dentários usados na cimentação de peças protéticas, bem como seus protocolos de aplicação clínica. Porém, permanece patente que pouco se conhece sobre as propriedades biológicas desses cimentos, especialmente àqueles que contêm resina na sua composição. Assim, para que os diferentes tipos de cimentos resinosos e suas técnicas de aplicação sejam usados de forma segura, preservando a vitalidade do complexo dentina-polpa, é imprescindível que pesquisas *in vitro*, com potencial para simular situações clínicas, bem como testes posteriores *in vivo* e pré-clínicos, sejam realizados com estes produtos. Todavia, a execução da primeira etapa de testes biológicos em laboratório tem esbarrado na dificuldade de se obter dentes humanos íntegros e em quantidade adequada para assegurar a qualidade científica das pesquisas. Este fato tem levado muitos pesquisadores a utilizar dentes de diferentes mamíferos, tal como àqueles de origem bovina. Todavia, para que os dados de pesquisas realizadas com espécimes obtidos de dentes bovinos sejam relevantes para a Odontologia, as características gerais destes tecidos, tais como a morfologia e composição, devem ser semelhantes àquelas observadas em dentes humanos. Especificamente para avaliação dos efeitos citotóxicos indiretos de materiais dentários, a observação da semelhança estatística dos resultados obtidos quando da aplicação de um mesmo material sobre barreiras de dentina obtidas de dentes humanos e bovinos, seria um indicativo de que este substrato tubular bovino tem potencial para substituir o humano. Assim, a possibilidade de empregar, com segurança, DB como substituto da DH para testes de citotoxicidade transdentinária de materiais dentários, poderá trazer importante contribuição para diferentes áreas da Odontologia, bem como colaborar com o desenvolvimento de produtos inovadores biocompatíveis.

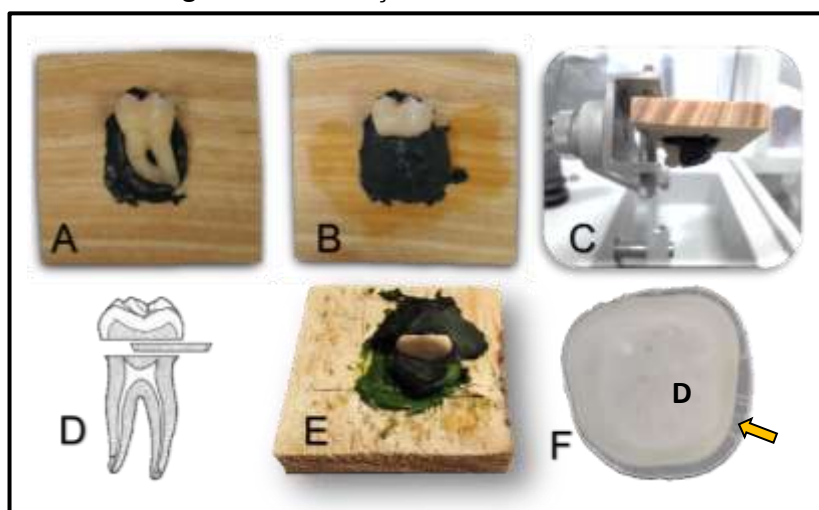
4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Preparação das CPAs e Análise Morfológica dos Discos de DH e DB.

4.1.1 Obtenção dos discos de DH

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE: 14845019.3.0000.5416 – ANEXO), terceiros molares humanos hígidos foram obtidos (n=60) de voluntários de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 e 25 anos, os quais foram atendidos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. Após remoção mecânica dos restos de ligamento periodontal, os dentes foram armazenados em recipiente de vidro contendo 300 mL de timol 0,1% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Da coroa de cada dente, foi obtido um disco de dentina (Figura 1), utilizando-se para isto disco de diamante (11-4254, 4"x 0,012"/ série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA) acoplado numa cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA). Os cortes do dente foram realizados em baixa velocidade, sendo o disco resfriado com água durante todo procedimento^{6,39}.

Figura 1 - Obtenção de um disco de DH.



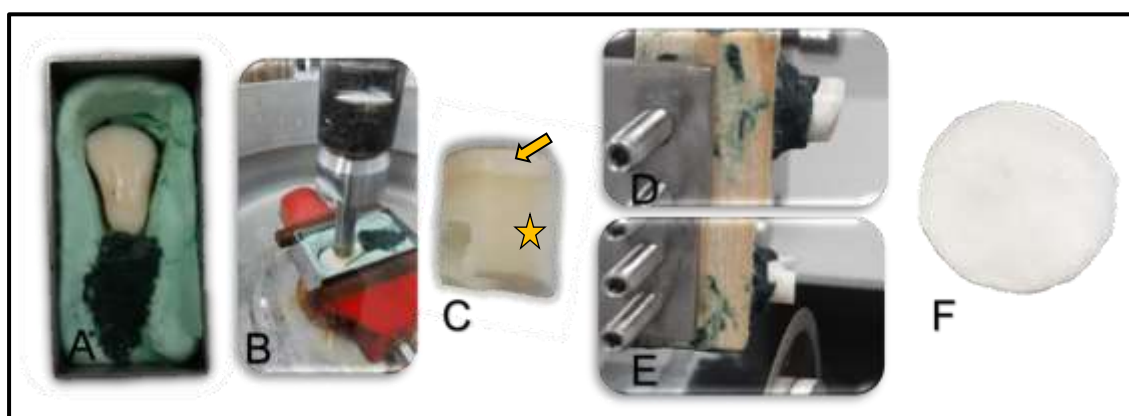
A) Molar humano íntegro fixado numa base de madeira com godiva aquecida; B) Raízes do dente cobertas com godiva para melhor estabilização durante a obtenção dos discos de dentina; C) Superfície de madeira acoplada na cortadeira metalográfica; D) Região do dente onde é retirado o disco de DH; E) Dente após realização dos cortes; F) Disco obtido com estrutura de esmalte (seta) e dentina (D).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.2 Obtenção dos discos de DB

Sessenta incisivos bovinos (3 anos de idade) sem manchas, com ausência de desgaste excessivo do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e/ou trincas no esmalte, tiveram os restos de ligamento periodontal removidos e então foram imersos em solução de timol 0,1% (Sigma-Aldrich). Cada dente foi fixado numa base metálica com silicone de condensação (Perfil, Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e godiva aquecida (Lysandra, Lysanda Prod. Odontologicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Então, um disco de esmalte/dentina foi obtido da porção média da face vestibular de cada dente (Figura 2), usando para isso broca diamantada do tipo trefina com 8 mm de diâmetro interno (Dinser brocas diamantadas LTDA, São Paulo, SP, Brasil) conectada em furadeira de bancada (FSB 16 Pratika, Schultz, Joinville, SC, Brasil). Todo procedimento foi realizado com os dentes imersos em água, na temperatura de 4°C¹⁰⁶. A seguir, o esmalte dos discos foi cuidadosamente removido com auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda.), onde um disco diamantado (11-4254, 4"x 0,012"/ série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda.) em baixa rotação e sob refrigeração constante (parcialmente imerso em água) exercia pressão de corte constante sobre os tecidos dentários.

Figura 2 – Obtenção de um disco de DB



A) Incisivo bovino fixado numa base metálica com silicone de condensação e godiva aquecida; B) Corte da porção média da face vestibular do incisivo bovino para obtenção de um disco de esmalte/dentina, usando para isso broca diamantada do tipo trefina; C) Disco de esmalte (seta)/dentina (estrela). D) Disco de esmalte/dentina posicionado em cortadeira metalográfica para remoção do esmalte; E) Após corte do esmalte, o disco é girado de tal maneira que parte do tecido dentinário seja cortado para obter discos de dentina com espessura de aproximadamente 0,5 mm; F) Disco de dentina bovina.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.3 Padronização dos discos de dentina

As superfícies superior e inferior dos discos de DH e DB foram lixadas e regularizadas com lixas d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) até a obtenção de uma espessura de 0,4 mm, avaliada por meio de paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil). O diâmetro dos discos foi reduzido com ponta diamantada cilíndrica (número 1095 - KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em alta rotação e sob refrigeração constante, sendo o acabamento feito em baixa rotação, de tal forma que o diâmetro final dos discos fosse de 8 mm. A seguir, a condutância hidráulica dos discos de dentina foi determinada, de tal forma que não houvesse diferença entre os grupos quando essas amostras fossem distribuídas entre os grupos estabelecidos no estudo.

Este procedimento permite padronizar os testes de citotoxicidade transdentinária, evitando que as variações de permeabilidade do substrato possam interferir na avaliação comparativa dos resultados⁶. Para realizar o teste de condutância hidráulica, 50 µL da solução de 0,5 M de sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético dihidratado (EDTA; pH= 7,4; Sigma-Aldrich) foi aplicado, com auxílio de uma micropipeta (Micropipeta Monocanal Labmate HTL soft, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), em cada um dos lados dos discos de dentina por 30 segundos para remoção da smear layer. Com uso de uma pisseta de plástico de 500 mL (J. Prolab, São José do Pinhais, PR, Brasil), as superfícies dos discos foram abundantemente lavadas com água deionizada por 30 segundos^{6,107}.

Para proceder a limpeza final dos discos, estes foram individualmente adaptados em uma câmara pulpar de perfusão conectada a uma coluna d'água destilada de 180 cm. Então, foi realizada a exsudação transdentinária do líquido pelo período de 5 minutos^{6,39}. A condutância hidráulica de cada disco foi mensurada, utilizando a fórmula $L_p = J_v / A \cdot \Delta P \cdot t$, onde "Lp" é a condutância hidráulica (Lp: µL/cm²/min/cm H₂O); "Jv" o volume de fluido em microlitros por milímetro; "A" a área da superfície da dentina (cm²); "ΔP" a pressão hidrostática em centímetro de H₂O; e "t" é o tempo necessário para o movimento do fluido (minutos)^{5,6,39}. Em seguida, os discos de dentina foram distribuídos entre os grupos experimentais e controle positivo de forma que os valores médios de permeabilidade dentinária não apresentassem diferença significativa entre eles³⁹, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Média de permeabilidade dos discos de DH e DB de acordo com os grupos experimentais.

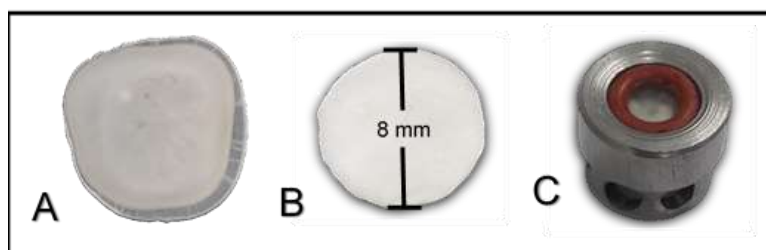
Células	Grupos							
	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
MDPC-23	2.49 ±1.44 a	2.52 ±1.53 a	2.49 ±1.27 a	2.58 ±1.34 a	2.48 ±1.14 a	2.58 ±1.40 a	2.48 ±1.45 a	2.58 ±1.22 a
HDPCs	4.14 ±2.48 a	3.13 ±1.97 a	4.13 ±2.62 a	3.11 ±1.55 a	4.11 ±2.71 a	3.11 ±2.05 a	4.11 ±2.32 a	3.13 ±1.90 a

Média e desvio padrão da permeabilidade discos de DH e DB. Para cada linhagem celular, grupos identificados com a mesma letra minúscula não indicam diferença estatística. (Anova one-way, $\alpha=0,05$, $p=1$ para MDPC-23, $p=0,928$ para HDPCs).

Fonte: Elaboração própria.

Estabelecidos os grupos, a superfície oclusal dos discos foi lixada por 10 segundos com lixa d'água de granulação de 320 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil) com objetivo de padronizar a espessura da smear layer formada^{6,107}. Finalmente, os discos foram adaptados em câmaras pulpares artificiais (CPAs) (Figura 3) entre dois anéis de silicone (Rodimar Rolamentos Ltda, Araraquara, SP, Brasil) selados com cera rosa (Lysanda, São Paulo, SP, Brasil) e os conjuntos CPA/disco de dentina esterilizados em óxido de etileno (ACECIL Com. Ind. Ltda, Campinas, SP, Brasil)¹⁰⁷.

Figura 3 - Padronização do disco de DH



A) Disco de esmalte/dentina obtido de molar humano íntegro; B) Após remoção do esmalte, o disco passou a exibir 8 mm de diâmetro; C) Disco acoplado na câmara pulpar artificial, onde foi mantido em posição através do uso de anéis de silicone.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.1.4 Morfologia dos discos de dentina (n=6)

Com o objetivo de avaliar e comparar as características morfológicas referentes ao número e diâmetro dos túbulos dentinários dos discos de DH e DB, as amostras foram primeiramente lavadas por 60 segundos (30 segundos cada superfície) com 50

μL da solução de 0,5 M de sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético dihidratado (EDTA; pH= 7,4; Sigma-Aldrich), usando para isso uma micropipeta (Micropipeta Monocanal Labmate HTL soft). Em seguida, com uso de uma pisseta de plástico de 500 mL (J. Prolab), cada superfície dos discos foi abundantemente lavada com água deionizada por 30 segundos^{6,15,16,107}.

Para proceder a limpeza de possíveis resíduos presentes no interior dos túbulos dentinários, cada disco foi individualmente adaptado numa câmara pulpar de perfusão conectada a uma coluna d'água destilada de 180 cm. Então, foi realizada a exsudação transdentinária do líquido pelo período de 5 minutos^{6,39} e a condutância hidráulica de cada disco foi mensurada conforme descrito anteriormente.

Os discos de DH e DB foram então fixados com fita de carbono (Koch Electron Microscopy, Rave Scientific, Heller Park Lane Somerset, NJ, EUA) sobre stubs metálicos circulares, os quais foram mantidos por 7 dias em dessecador (Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil). Após esse período, procedeu-se a metalização dos discos com ouro por 40 segundos (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil). Finalmente, a morfologia da dentina foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (JSM7500F, JEOL Ltda., Akishima, Tóquio, Japão) nos aumentos de $\times 1.000$ e $\times 5.000$. Para isso, um campo central padronizado de cada amostra foi selecionado para obtenção de uma fotomicrografia representativa de cada grupo nos diferentes aumentos¹⁶. As imagens em MEV foram processadas usando o software ImageJ (National Institutes of Health – NIH, Bethesda, MD, EUA), o qual permite contar objetos e calcular áreas, perímetros e distâncias selecionadas a partir de medições padronizadas. A escala presente nas imagens em MEV (aumento de $\times 5.000$) foi utilizada para calibração da régua de medida do programa, o que permitiu determinar o diâmetro dos túbulos dentinários. Para realizar esta análise, o diâmetro de 5 túbulos dentinários presentes em cada imagem foi medido¹⁶. O número de túbulos dentinários em cada disco foi verificado a partir da contagem destas estruturas presentes na área de $10.800 \mu\text{m}^2$, a qual foi selecionada de fotomicrografias obtidas em aumento de $\times 1.000$ ¹⁶.

4.2 Citotoxicidade Transdentinária de Materiais Utilizados para Cimentação de Peças Protéticas (MDPC-23).

4.2.1 Materiais resinosos

Os materiais selecionados para este estudo foram o sistema adesivo Single Bond Universal (3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil), cimento de ionômero de vidro modificado por resina RelyX Luting 2 (3M ESPE), cimento resinoso autoadesivo RelyX U200 (3M ESPE) e cimento resinoso adesivo RelyX Ultimate (3M ESPE). Detalhes da composição química dos materiais em questão estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação dos materiais resinosos e seus componentes.

Material	Classificação	Composição	% por peso
Single Bond Universal	Adesivo dentinário	Metacrilato de 2-hidroxietila	15 - 25
		Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato (BisGMA)	15 - 25
		1,10-Decanodiol fosfato metacrilato	10 - 20
		Etanol	10 - 15
		Água	10 - 15
		Ácido 2-propenóico, 2-metil-, 3- (trimetoxisilil) éter propilo	7 - 13
		Canforoquinona	<2
RelyX Luting 2	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina	Pasta A	
		Vidro tratado com silano	70 - 80
		Água	10 - 20
		2-hidroxietil metacrilato (HEMA)	< 10
		4-(Dimetilamino) -Benzenoetanol	< 1
		Óxido de titânio	< 0,5
		Pasta B	
		Cerâmica silanizada tratada	30 - 40
		2-hidroxietil metacrilato (HEMA)	10 - 30
		Copolímero de ácido acrílico e ácido	10 - 30
		Água	5 - 15
		Persulfato de potássio	1 - 5
RelyX U200	Cimento resinoso autoadesivo	Pasta A	
		Pó de vidro	45 - 55
		2-Ácido propenóico, 2-metil-, 1,1 '- [1- (hidroximetil) -1,2-etanodiil] éster, produtos da reação com 2-hidroxi-1,3-propanodiildimetacrilato e óxido de fósforo	20 - 30
		Dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA)	10 - 20
		Persulfato de sódio	< 3
		Ácido acético	< 0,1
		Pasta B	
		Pó de vidro	50-70
		Dimetacrilato substituída	20 - 30
		1,12-Dodecano dimetacrilato	< 5
		Ácido 2-propanóico, 2-metil[(3- metoxipropil)imino]di-2,1-etanodiil éster	< 2
		Hidróxido de cálcio	< 2
		Ácido 2-Propenóico, 2-Metil-, 2-[(2- Hidroxietil)(3-Metoxipropil)Amino]EtilÉster	< 0,5
		Dióxido de titânio	< 0,5
		Pasta A	
		Pó de vidro	50 - 60
		2-propanóico, 2-metil-, 1,1 '- [1- (hidroximetil) -1,2-etanodiil] ester, produtos da reação com 2-hidroxi-1,3-propanodiilodimetacrilato e óxido de fósforo	20 - 30
RelyX Ultimate	Cimento resinoso adesivo	Dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA)	10 - 20
		Persulfato de sódio	< 1,0
		Terc-butil 3,5,5-trimetil peroxihexanoato	< 0,5
		Ácido acético	< 0,1
		Pasta B	
		Pó de vidro	55 - 65
		Dimetacrilato substituída	20 - 30
		1,12-Dodecano dimetacrilato	< 5
		Ácido 2-propanóico, 2-metil[(3- metoxipropil)imino]di-2,1-etanodiil éster	< 2
		Hidróxido de cálcio	< 2

Fonte: Elaboração própria a partir de informações fornecidas pelo fabricante.

4.2.2 Análise de pH (n=5)

Para avaliar o pH de extratos de cada material resinoso usado neste estudo (Tabela 1), estes foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante e inseridos em matrizes metálicas com dimensões padronizadas (8 mm de diâmetro e 2 mm de altura). Essas matrizes foram posicionadas entre duas lâminas de vidro (Perfecta, Perfecta Ltda., São Paulo, SP, Brasil) revestidas por filme plástico¹⁰⁸, tal como demonstrado na Figura 4. Para obter os corpos de prova do cimento RelyX Luting 2, o material resinoso permaneceu no interior das matrizes até completar o período para sua presa química (5 minutos). Os corpos de prova dos cimentos RelyX U200 e RelyX Ultimate foram submetidos à presa química por 6 minutos, conforme a recomendação do fabricante. Para avaliação do sistema adesivo Single Bond Universal, 10 µL do adesivo foi aplicado sobre disco de papel filtro (J. Prolab) com 5 mm de diâmetro e 0,16 mm de espessura e fotopolimerizado por 10 segundos (Valo, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA; irradiância: 1000 mW cm²)¹⁰⁹. Seguindo as recomendações da ISO 10993-12¹¹⁰ para obtenção de extratos de materiais dentários, os corpos de prova preparados foram individualmente posicionados no fundo de compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) contendo 500 µL de meio de cultura puro (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EUA –12100-046 10 x 1 L). Como controle negativo (CN) foi utilizado o meio de cultura puro (DMEM, Gibco).

O pH dos extratos (DMEM + componentes liberados dos materiais resinosos) foi determinado através de mensurações realizadas imediatamente após imersão dos corpos de prova no DMEM, bem como nos períodos seguintes de 1 e 24 horas. Estas avaliações foram realizadas com uso de um pHmetro (HI 2221 Calibration Check pH/ORP Meter, Hanna instruments, Woonsocket, RI, EUA).

Figura 4 - Confeção de corpos de prova com cimento resinoso



Cimento resinoso inserido em matriz metálica bipartida com diâmetro e espessura padronizadas, a qual foi posicionada entre duas lâminas de vidro revestidas com filme plástico, até o final de sua presa.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Todos os protocolos laboratoriais descritos a seguir foram realizados para os discos de DH e DB adaptados, individualmente, em CPAs.

4.2.3 Cultivo de células odontoblastóides MDPC-23

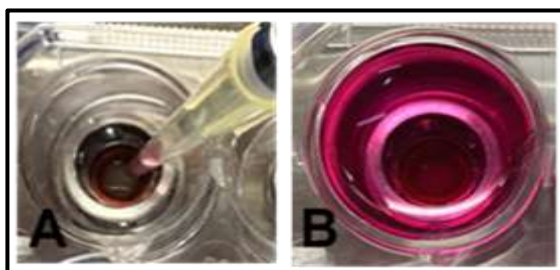
Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 (passagem # 64), as quais estavam estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr./Unesp, foram usadas neste estudo. Após descongelamento, as células foram cultivadas em placas de petri esterilizadas com 10 cm de diâmetro (Kasvi) utilizando DMEM (Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) 100 IU/mL e 100 mg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina (Gibco) em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar (Thermo Fisher Scientific, RCO3000T-5-VBC, Asheville, NC, EUA). As substituições do DMEM completo ocorreram a cada 72 horas, sendo o subcultivo celular realizado com o uso da solução de EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich). Este procedimento de subcultivo celular foi repetido até que se obtivesse o número de células suficiente para a completa execução do estudo.

4.2.4 Procedimento experimental

Após esterilização, os conjuntos disco/CPA foram individualmente inseridos em placas de 24 compartimentos (Kasvi), de tal forma que a superfície pulpar dos discos de DH e DB ficasse voltada para cima. Então, células MDPC-23 dispersas em 20 µL

de DMEM completo foram semeadas (3×10^4 células/disco) sobre a superfície pulpar dos discos. As placas com os conjuntos disco/CPA foram colocadas em incubadora (Thermo Fisher Scientific), por 30 minutos à 37°C e 5% CO₂ para permitir a adesão inicial das células ao substrato. Em seguida, 1 mL de DMEM completo foi adicionado em cada compartimento, e os conjuntos disco/CPA incubados por 48 horas adicionais (Figura 5).

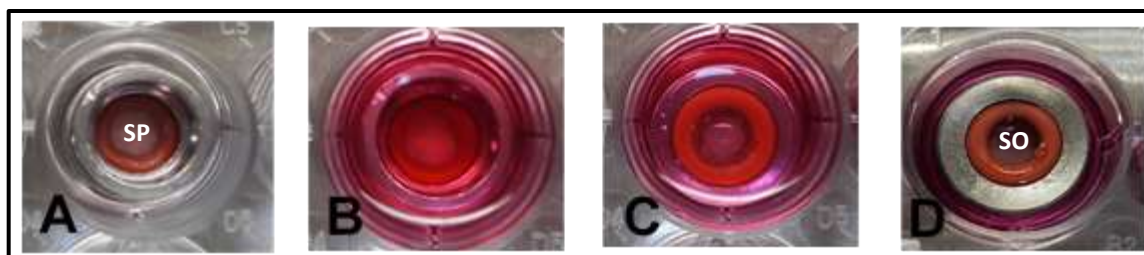
Figura 5 - Cultura de células MDPC-23 na superfície pulpar de um disco de dentina



A) Após posicionamento do conjunto disco/CPA no compartimento de uma placa de acrílico de 24 compartimentos, o volume total de 20 μ L de DMEM completo contendo células MDPC-23, foi aplicado com pipeta sobre a superfície pulpar do disco de dentina; B) Após 30 minutos de incubação, 1 mL de DMEM completo foi adicionado em cada compartimento da placa.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após este período, o DMEM completo foi aspirado e 2 mL de meio de cultura sem SFB (DMEM-SFB) foi aplicado em cada compartimento da placa. Neste momento, os conjuntos disco/CPA foram cuidadosamente girados dentro dos compartimentos das placas, de tal maneira que a superfície oclusal dos discos permanecesse voltada para cima. Em seguida, 1 mL de DMEM-SFB foi aspirado de cada compartimento para expor a superfície oclusal dos discos de dentina (Figura 6).

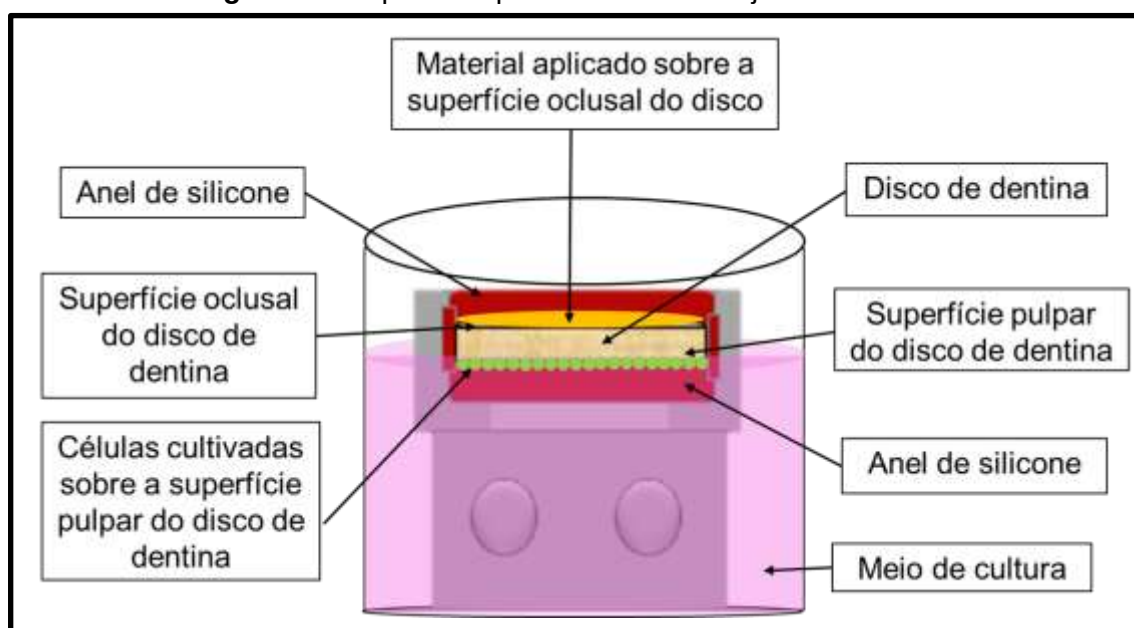
Figura 6 - Procedimento experimental

A) Após aspirar o DMEM completo do compartimento, é possível observar a superfície pulpar do disco de dentina (SP), onde as células MDPC-23 estão aderidas; B) O volume de 2 mL de DMEM-SFB foi aplicado no compartimento; C) Após girar o conjunto disco/CPA, a superfície oclusal do disco de dentina passou a ficar voltada para cima. Consequentemente, a superfície pulpar do disco, com as células aderidas sobre ela, permaneceu voltada para baixo, simulando a situação de um dente vital, onde a camada odontoblástica reveste internamente a dentina; D) O volume total de 1 mL de DMEM-SFB foi aspirado, de tal forma que a superfície oclusal (SO) do disco foi exposta para receber os tratamentos estabelecidos. O DMEM-SFB que ainda permaneceu no compartimento se manteve em contato com a superfície pulpar do disco para conservar as células metabolicamente viáveis.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Com a superfície oclusal dos discos de dentina expostas, este substrato foi lavado com 1 mL de PBS 1X e então cuidadosamente seco com discos de papel absorvente esterilizados (J. Prolab). Em seguida, os materiais resinosos em teste foram preparados de acordo com as recomendações de seus fabricantes e imediatamente aplicados, com auxílio de uma pipeta de alta viscosidade (Microman, Gilson Corporation, WI, EUA), sobre a superfície oclusal dos discos. Um esquema representativo do conjunto disco/CPA posicionado no compartimento de uma placa de acrílico esterilizada de 24 compartimentos está apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema representativo do conjunto disco/CPA



Observe o disco de dentina adaptado entre dois anéis de silicone na CPA. As células MDPC-23 estão aderidas na superfície pulpar do disco de dentina (em contato como DMEM-SFB), sendo que o material resinoso é aplicado sobre a superfície oclusal do mesmo (voltada para cima).

Fonte: Elaboração própria

Os grupos estabelecidos neste estudo laboratorial, bem como os protocolos de aplicação deles sobre o substrato dentinário estão demonstrados na Tabela 3. Como controle negativo (CN: grupos G1 e G2), não foi realizado qualquer tratamento sobre a dentina. Como controle positivo (CP: grupos G3 e G4), foi utilizado o sistema adesivo Single Bond Universal (3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil).

Tabela 3 - Relação entre os grupos estabelecidos neste estudo laboratorial e os tratamentos realizados na superfície oclusal dos discos de dentina.

Grupos	Protocolos de aplicação
G1 (CN) Sem tratamento/DH	A superfície oclusal da dentina foi lavada e aspirada com 1 mL de PBS 1X. O excesso de umidade foi removido com discos de papel absorvente (J. Prolab).
G2 (CN) Sem tratamento/DB	
G3 (CP) Single Bond Universal/DH	A superfície oclusal da dentina foi lavada e aspirada com 1 mL de PBS 1X. Gel de ácido fosfórico 37% (Condac 37, Dentscare Ltda., Joinville, SC, Brasil) foi aplicado por 15 segundos, lavado e aspirado com 2 mL PBS 1X. O excesso de umidade foi removido com discos de papel absorvente (J. Prolab). Uma camada do sistema adesivo (5 µL) foi aplicada ativamente na dentina por 20 segundos. Um leve jato de ar foi aplicado por 5 segundos e o adesivo fotopolimerizado por 10 segundos (Valo, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA; irradiância: 1000 mW cm ²).
G4 (CP) Single Bond Universal/DB	
G5 RelyX Luting 2/DH	A superfície oclusal da dentina foi lavada e aspirada com 1 mL de PBS 1X. Discos de papel absorvente (J. Prolab) foram utilizados para remover o excesso de umidade. O material foi dispensado em bloco de mistura e aplicado 20 µL sobre superfície oclusal dos discos de dentina e aguardado 5 minutos para a polimerização química, conforme recomendação do fabricante.
G6 RelyX Luting 2/DB	
G7 RelyX U200/DH	A superfície oclusal da dentina foi lavada e aspirada com 1 mL de PBS 1X. Discos de papel absorvente (J. Prolab) foram utilizados para remover o excesso de umidade. O material foi dispensado em bloco de mistura e aplicado 20 µL sobre superfície oclusal dos discos de dentina e aguardado 6 minutos para a polimerização química, conforme recomendação do fabricante.
G8 RelyX U200/DB	
G9 RelyX Ultimate/DH	A superfície oclusal da dentina foi lavada e aspirada com 1 mL de PBS 1X. Gel de ácido fosfórico 37% (Condac 37, Dentscare Ltda.) aplicado por 15 segundos, lavado e aspirado com 2 mL PBS 1X. O excesso de umidade foi removido com discos de papel absorvente (J. Prolab). Uma camada do sistema adesivo Single Bond Universal (5 µL) foi aplicada ativamente na dentina por 20 segundos. Um leve jato de ar foi aplicado por 5 segundos. O material foi dispensado em bloco de mistura e aplicado 20 µL sobre superfície oclusal dos discos de dentina e aguardado 6 minutos para a polimerização química, conforme recomendação do fabricante.
G10 RelyX Ultimate/DB	

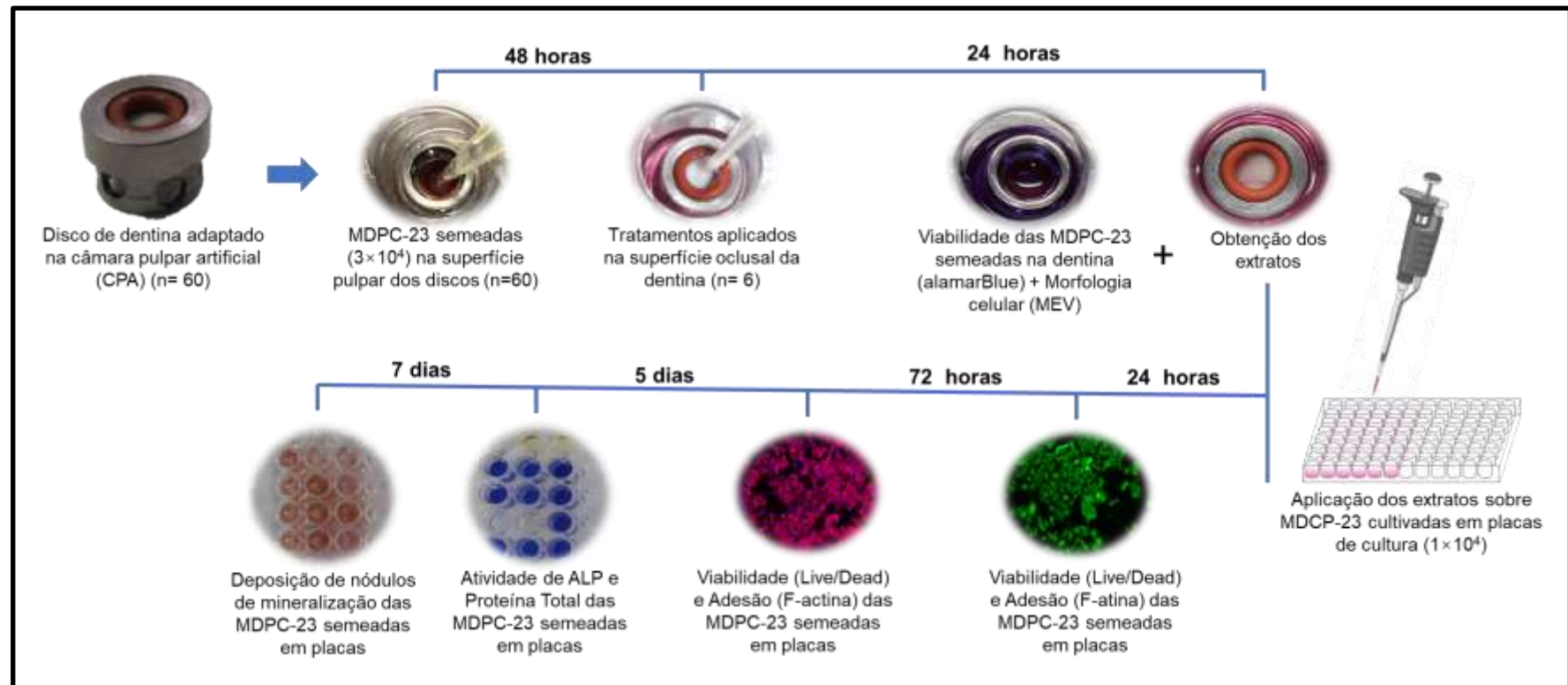
CN= controle negativo; CP= controle positivo

Fonte: Elaboração própria

Imediatamente após concluir a aplicação dos materiais sobre a superfície oclusal dos discos, as placas com os conjuntos disco/CPA foram colocadas em incubadora (Thermo Fisher Scientific) por 24 horas. Após este período, os conjuntos foram cuidadosamente removidos dos compartimentos, girados e então individualmente posicionados em compartimentos de novas placas de acrílico de 24 compartimentos (Kasvi). Com este procedimento, a superfície pulpar dos discos voltou a ser direcionada para cima, permitindo a análise da viabilidade das células MDPC-23 (AlamarBlue Assay) que permaneceram aderidas ao substrato dentinário. Detalhes deste protocolo está descrito mais adiante (item 4.2.5). Para todos os grupos deste

estudo, o volume total de 1 mL de DMEM-SFB contendo os componentes dos materiais dentários que se difundiram através do disco de dentina, agora denominado de extrato, foi coletado. Uma alíquota de 100 µL deste extrato foi imediatamente aplicada sobre as células odontoblastóides MDPC-23 previamente cultivadas (1×10^4 células/compartimento) em placas de 96 compartimentos (Kasvi). Após incubar as células em contato com os extratos por 24 horas, esses extratos foram aspirados e um novo DMEM contendo 10% de SFB foi aplicado em cada compartimento. Então, as células foram submetidas aos testes de viabilidade (Live/Dead), bem como adesão e espalhamento celular (F-actina)¹¹¹. Também foi avaliado a influência dos extratos obtidos de cada material sobre a atividade de enzima fosfatase alcalina (Timolftaleína Monofosfato) e deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red)^{6,111}. Para isso, células MDPC-23 semeadas nas placas de 96 compartimentos permaneceram 24 horas em contato com 100 µL dos extratos dos materiais testados. Após este período, os extratos foram aspirados e 200 µL de meio osteogênico, preparado com DMEM suplementado com 10% de SFB, 0,2 M de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e 5 M de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), foi aplicado sobre as células até o momento da realização das análises, tal como descrito mais adiante. As substituições do meio osteogênico ocorreram a cada 24 horas. Para melhor compreensão da análise de citotoxicidade sobre células odontoblastóides MDPC-23, foi elaborado um fluxograma referente a sequência metodológica empregada, o qual está demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da sequência de procedimentos laboratoriais usados para analisar a citotoxicidade transdentinária dos materiais dentários sobre células MDPC-23.



Fonte: Elaboração própria

4.2.5 Viabilidade das células MDPC-23 cultivadas sobre dentina (n=6)

Em cada compartimento das placas de acrílico de 24 compartimentos, onde os conjuntos disco/CPA foram posicionados com a superfície pulpar, contendo células MDPC-23, voltada para cima, foi aplicado a solução composta por 900 µL de DMEM-SFB e 100 µL da solução de Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA). As células foram incubadas em contato com esta solução por 4 horas, sendo que após esse período, 2 alíquotas de 100 µL foram obtidas de cada compartimento e transferidas para placas de 96 compartimentos para realização da leitura de fluorescência com 540 nm de excitação e 590 nm de emissão (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA)¹¹¹.

4.2.6 Morfologia das células MDPC-23 cultivadas sobre dentina (n=2)

A morfologia das células que se mantiveram aderidas na superfície pulpar dos discos de DH e DB após 24 horas da aplicação dos materiais em teste foi avaliada. Para isso, os discos retirados das CPAs foram individualmente colocados em placas de 24 compartimentos contendo 500 µL de glutaraldeído 2,5% (VETEC Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Decorridos 60 minutos deste procedimento de fixação inicial das células, a solução de glutaraldeído foi aspirada e os discos submetidos a 2 lavagens de 5 minutos com 1 mL de PBS 1X. Em seguida, 100 µL da solução de tetróxido de ósmio a 1% (Sigma-Aldrich) foi aplicado por 60 minutos sobre os discos para fazer a pós-fixação das células. Então, os discos foram novamente lavados por duas vezes em 1 mL de PBS 1x (5 minutos cada lavagem), seguida por lavagem com 1 mL água destilada por 5 minutos adicionais. Imediatamente após, as amostras foram submetidas à desidratação química realizada por meio de trocas de 1 mL de etanol em concentrações crescentes: 30 minutos em etanol 30%, 50% e 70% e 60 minutos em etanol 95% e 100% (2 trocas de 30 minutos). Concluída a desidratação com etanol, 100 µL da solução de 1,1,1,3,3,3,- hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma-Aldrich) foi aplicado por 60 minutos (3 trocas de 20 minutos)¹⁰⁷. Todos os procedimentos foram realizados no interior de capela de exaustão (QUIMIS, Aparelhos Científicos LTDA., Q-216-12, Diadema, SP, Brasil). Então, os discos com as células aderidas sobre sua superfície foram fixados com fita de carbono (Koch Electron Microscopy, Rave Scientific) em stubs metálicos, os quais foram mantidos por 7 dias em dessecador (Laborquimi Ltda.). Após esse período, procedeu-se a

metalização dos discos com ouro por 40 segundos (Sistevac), os quais foram posicionados em microscópio eletrônico de varredura nos aumentos de $\times 500$ e $\times 1.000$ (JSM7500F, JEOL Ltda.) para análise da morfologia celular. Para isso, um campo padronizado da região central das amostras foi selecionado para obtenção de fotomicrografias representativas de cada grupo^{3,107}.

4.2.7 Viabilidade das células MDPC-23 expostas aos extratos (Live/Dead, n=4)

Após 24 e 72 horas da aplicação dos extratos obtidos de cada grupo sobre as células, 100 μL de DMEM–SFB suplementado com 2 $\mu\text{L/mL}$ de Calcein AM e 0,25 $\mu\text{L/mL}$ de Ethidil Homodímero-1 (Live/Dead cell viability/cytotoxicity kit, Invitrogen, San Francisco, CA, EUA) foi aplicado por 30 minutos (ausência de luz) em cada compartimento. Então, 4 campos padronizados da região central dos compartimentos das placas foram selecionados para obtenção de fotomicrografias representativas de cada grupo (células vivas e mortas) em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) no aumento de $\times 10$. As imagens das células foram submetidas à análise qualitativa, sendo que os dados foram expressos de forma descritiva¹¹¹.

4.2.8 Adesão/espalhamento das células MDPC-23 expostas aos extratos (F-actina, n=4)

Após 24 e 72 horas de aplicação dos extratos sobre as células MDPC-23 semeadas nas placas de 96 compartimentos, as células foram fixadas com 100 μL de paraformaldeído 4% (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com 200 μL PBS 1X, e então submetidas à permeabilização de membrana com 50 μL de 0,1% de Triton X100 (Sigma-Aldrich). Após realizar nova lavagem com 200 μL de PBS 1X, as células foram incubadas por 20 minutos com 50 μL sonda fluorescente específica (F-actina; Life Technologies) na concentração de 1:20 em BSA 2% (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) para detecção de filamentos de actina. Então, as células foram novamente lavadas com 200 μL PBS 1X, sendo que para verificar a presença de células viáveis, foi realizada a marcação nuclear utilizando um intercalante de DNA fluorescente (Hoescht, Invitrogen, San Francisco, CA, EUA). Para tal marcação, o reagente de Hoescht (Invitrogen) foi preparado na concentração de 1:5000 em PBS

1X, e 100 µL desta solução foi aplicado por 15 minutos sobre as células na ausência da luz. Então, foram selecionados 4 campos padronizados na região central dos compartimentos das placas para realização da análise em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B) com magnificação de $\times 10$. A avaliação da adesão e espalhamento das células MDPC-23 expostas aos extratos de cada grupo foi realizada por meio de análise qualitativa, sendo os dados expressos de forma descritiva¹¹¹.

4.2.9 Avaliação da expressão fenotípica das células MDPC-23 expostas aos extratos (n=6)

Para realização desta análise, células semeadas em placas de 96 compartimentos foram expostas por 24 horas aos extratos obtidos de cada grupo estabelecido neste estudo. Após este período, os extratos foram aspirados e as células mantidas em meio osteogênico (MO) por 5 dias (MO substituído a cada 24 horas), até a realização das análises da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e deposição de nódulos de mineralização, tal como descrito a seguir:

- Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP, n=6): Após manter as células em MO por 5 dias, a atividade da enzima ALP foi analisada com o uso do protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Para isso, o MO foi aspirado e as células lizadas em temperatura ambiente por 40 minutos em contato com 100 µL de lauril sulfato de sódio à 0,1% (Sigma-Aldrich). Após este período, uma alíquota de 10 µL do lisado de células foi transferida para uma placa de 48 poços (Kasvi), a qual foi previamente preparada com 10 µL de substrato (timolftaleína monofosfato; 22 mmol/L; reagente nº 1 do Kit) e 100 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10.1; reagente nº 2 do Kit) e pré-incubada por 15 minutos à 37°C. Após transferência do lisado de células para a placa previamente preparada e incubada, foi realizada uma nova incubação por 15 minutos à 37°C. Em seguida, 400 µL de reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L; reagente nº 3 do Kit) foi adicionado aos poços da placa de 48 poços (Kasvi), e então duas alíquotas de 100 µL de cada amostra foram transferidas para uma nova placa de 96 compartimentos (Kasvi) para leitura da absorbância em espectrofotômetro à 590 nm (Synergy H1)^{6,111}.

Para normalização da atividade da enzima ALP, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelas células, utilizando para isso o método de Lowry a partir de uma curva padrão (0; 32; 64; 96; 128; 160 µg/mL). No primeiro momento, uma alíquota de 25 µL da mesma amostra do lisado de células foi transferida para a placa de 96 compartimentos (Kasvi), sendo que em seguida 50 µL de solução de reagente de Lowry (Sigma-Aldrich) foi adicionado à placa e mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado 25 µL de solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma-Aldrich) na concentração 1:4 diluído em água destilada. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 655 nm (Synergy H1).

A dosagem de ALP (µmol de timolftaleína/mim=U) foi calculada a partir de uma curva padrão pré-estabelecida com as concentrações de 0; 1,818; 3,636; 7,272; 14,545; 21,818; 29,09 U/L de ALP (Reagente nº 4; Fosfatase Alcalina; Labest). Os dados foram normalizados a partir da divisão do valor da dosagem de ALP pelo valor obtido da quantificação de proteínas totais, sendo expressos em U/µg^{6,111}. Então, os valores foram transformados em porcentagem, sendo o grupo controle negativo (G1) considerado como 100% de atividade de ALP⁶.

- Deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red, n=6): Inicialmente, as células odontoblastóides MDPC-23 foram mantidas em cultura com MO pelo período de 7 dias. Após este período, o MO foi aspirado e as células fixadas com 200 µL de etanol 70% à 4°C por 1 hora. Então, as células foram lavadas com 200 µL água deionizada e incubadas com 100 µL de solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4,2; Sigma-Aldrich) por 20 minutos sob agitação (TS-2000A VDRL Shaker, Biomixer Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil)¹¹¹. Após realizar outras 3 lavagens sequenciais das células com 200 µL de água deionizada, 4 campos padronizados da região central dos compartimentos foram selecionados, de onde foram obtidas fotomicrografias (aumento de ×10) representativas dos nódulos de mineralização formados em cada grupo (Olympus BX51TF, Tóquio, Japão). Este protocolo permitiu a análise qualitativa dos nódulos formados. Em seguida, 100 µL da solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM, pH 7.0; Sigma-Aldrich) foi aplicado em cada compartimento da placa, a qual foi mantida em agitador (TS-2000A VDRL Shaker) por 20 minutos para dissolução dos

nódulos e quantificação dos mesmos através da leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm (Synergy H1)¹¹¹.

4.3 Citotoxicidade Transdentinária dos Extratos dos Materiais Utilizados para Cimentação de Peças Protéticas (HDPCs).

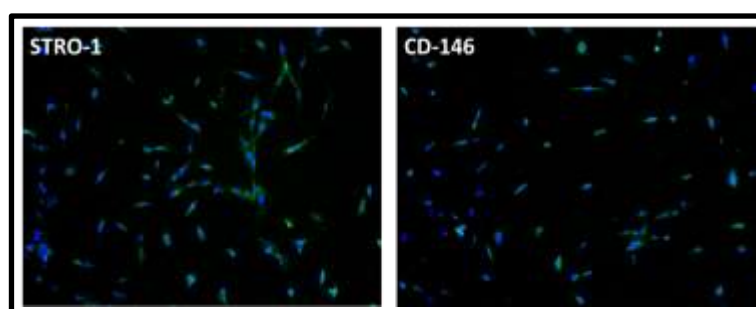
4.3.1 Cultura primária de HDPCs

Após aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE: 14845019.3.0000.5416 – ANEXO), quatro terceiros molares inclusos ou semi-inclusos íntegros foram obtidos de voluntários de ambos os sexos, com faixa etária entre 15 e 25 anos, os quais foram atendidos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp. Dentes com cárie, doença periodontal ou alterações endodônticas não foram incluídos no estudo. Após extração, os dentes foram acondicionados imediatamente em tubos falcon (Corning Inc., Corning, NY, EUA) contendo meio de cultura Alpha-Modified Eagle's Medium (α -MEM, Gibco – REF 11900-024 10x1 L) suplementado com 100 U/mL penicilina, 100 g/mL estreptomicina e 0,25 μ g/mL Fungizone (Gibco)^{111,113}.

Uma canaleta horizontal foi confeccionada 1 mm abaixo da junção amelo-cementária, utilizando para isso uma ponta diamantada nº 1095 (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) montada em motor de alta rotação, em ambiente asséptico e sob constante refrigeração. Dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (CleanPlus, Veco do Brasil, Campinas, SP, Brasil), a porção coronária foi mecanicamente separada da radicular, expondo o tecido pulpar. Com auxílio de limas endodônticas nº 10 esterilizadas (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça), o tecido pulpar foi coletado, picotado com lâmina de bisturi nº 15 (Maxicor, Pinhais, PR, Brasil), sendo que os fragmentos da polpa foram transferidos para garrafas de cultura de 25 cm² (Kasvi) contendo 5 mL de α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina (Gibco), 100 μ g/mL de estreptomicina (Gibco), 2 mmol/L de glutamina (Gibco) e 200 units/mL de collagenase Tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EUA). Após incubação por 24 horas, as células pulpares que se desprenderem dos fragmentos e se aderiram ao fundo dos frascos foram tripsinizadas (Trypsina 0,25%, Gibco) e subcultivadas em α -MEM suplementado com 10% de SFB. Células entre a 3ª e 7ª passagens foram utilizadas na presente etapa do estudo^{111,113}.

A identificação de células mesenquimais indiferenciadas (MSCs) na cultura primária das HDPCs foi realizada por meio de imunofluorescência. Para isto, lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro (Perfecta), foram esterilizadas e inseridas em placas de 24 compartimentos (Kasvi), sobre as quais, um total de 1×10^4 células foram semeadas. Após 24 horas de incubação, as células foram fixadas em 300 μ L de paraformaldeído 4% (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.), submetidas a duas lavagens com 1 mL PBS 1X e finalmente permeabilizadas com 300 μ L de Triton-X 100 a 0,1% (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. Após 3 lavagens com 1 mL de PBS 1X, foi realizado um bloqueio com 300 μ L de albumina e 5% de soro bovino (BSA; Santa Cruz Biotechnology) diluída em PBS 1X por 30 minutos e as células incubadas com 300 μ L de anticorpos primários (STRO-1, CD146; Santa Cruz Biotechnology) por 12 horas a 4°C¹¹³. Após este período, as células foram incubadas com 300 μ L de anticorpo secundário conjugado ao FITC (1:100; Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora, seguido de incubação com 300 μ L de Hoescht (1:5000; Hoescht, Invitrogen) por 15 minutos, para contra-marcação nuclear¹¹³. A emissão de fluorescência foi avaliada em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B), permitindo demonstrar que a cultura celular primária estabelecida e usada nesta etapa do estudo (HDPCs), apresentava subpopulação de células mesenquimais indiferenciadas (Figura 9)¹¹³.

Figura 9 - Imagens de imunofluorescência da cultura primária de HDPCs.



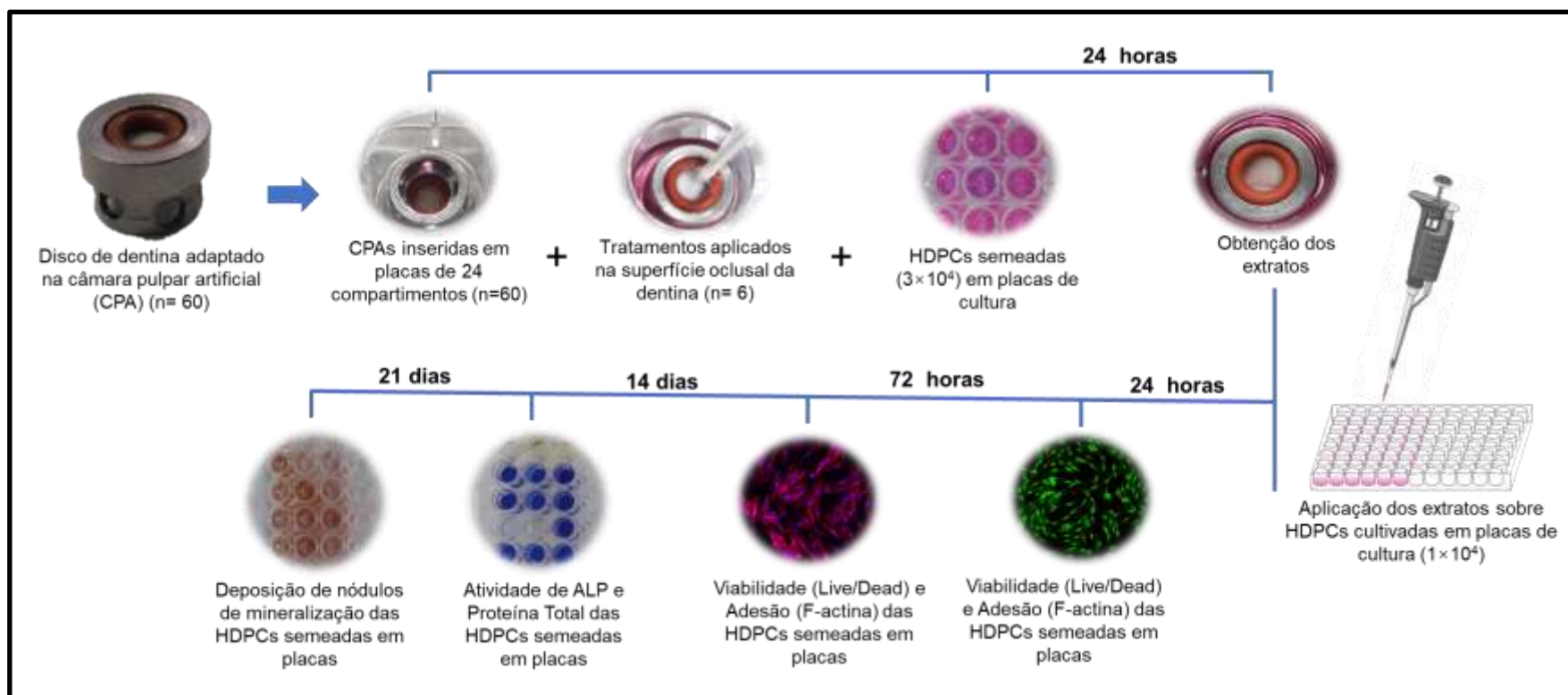
Caracterização da presença de uma subpopulação de células tronco mesenquimais indiferenciadas. Fluorescência azul (Hoescht) demonstra o núcleo celular. Fluorescência verde (FITC) demonstra as células positivas para os marcadores STRO-1 e CD-146 (aumento de 10x).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.2 Procedimento experimental

Usando α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de SFB (Gibco), 1×10^4 HDPCs foram semeadas em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas de 96 compartimentos (Kasvi) e incubadas por 24 horas. Enquanto isto, os materiais em teste (Tabela 1) foram aplicados sobre a superfície oclusal dos discos de DH e DB adaptados às CPAs (tal como anteriormente descrito). Após 24 horas de incubação, os extratos (1 mL) de todos os grupos foram coletados. Uma alíquota de 100 μ L destes extratos foi imediatamente aplicado sobre àquelas HDPCs previamente cultivadas em placas de 96 compartimentos (Kasvi), as quais foram colocadas em incubadora (Thermo Fisher Scientific) por 24 horas. Decorrido este período, os extratos foram aspirados e 100 μ L de α -MEM contendo 10% de SFB foi aplicado em cada compartimento. Então, as células foram submetidas aos testes de viabilidade (AlamarBlue e Live/Dead), bem como adesão e espalhamento celular (F-actina)¹¹¹. Também foi avaliado a atividade da enzima fosfatase alcalina (Timolftaleína Monofosfato – ALP) e deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red)^{6,111}. Para realizar estes dois últimos testes, as HDPCs previamente expostas aos extratos foram tratadas com 200 μ L de MO, o qual foi preparado com α -MEM suplementado com 10% de SFB, 0,2 M de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e 5 M de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). Para avaliar a atividade de ALP e formação de nódulos de mineralização, as células permaneceram imersas por 14 e 21 dias em MO, respectivamente, o qual era trocado a cada 48 horas. Para melhor compreensão da análise de citotoxicidade transdentinária dos extratos dos materiais utilizados para cimentação de peças protéticas (HDPCs), foi elaborado um fluxograma referente a sequência metodológica empregada, o qual está demonstrado na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática da sequência de procedimentos laboratoriais usados para analisar a citotoxicidade transdentinária dos extratos obtidos dos materiais dentários sobre as HDPCs.



Fonte: Elaboração própria

4.3.3 Citotoxicidade dos extratos sobre as HDPCs (AlamarBlue, n=6)

Após 24 e 72 horas da aplicação dos extratos sobre as HDPCs, essas células foram submetidas ao teste AlamarBlue para avaliação da viabilidade celular. Inicialmente, em cada compartimento das placas de acrílico de 96 compartimentos contendo células, foi aplicado uma solução composta por 90 µL de α -MEM-SFB e 10 µL da solução de Alamar Blue (Life Technologies). As células foram incubadas com esta solução por 4 horas, sendo que após esse período foi realizada a leitura de fluorescência com 540 nm de excitação e 590 nm de emissão (Synergy H1)¹¹¹.

4.3.4 Citotoxicidade dos extratos sobre as HDPCs (Live/Dead, n=4)

Protocolo realizado como descrito anteriormente no item 4.2.7.

4.3.5 Adesão/espalhamento das HDPCs expostas aos extratos (F-actina, n=4)

Protocolo realizado como descrito anteriormente no item 4.2.8.

4.3.6 Expressão fenotípica das HDPCs expostas aos extratos (atividade de ALP e formação de nódulos de mineralização, n=6)

Para avaliação da expressão fenotípica das HDPCs, as células previamente semeadas em placas de 96 compartimentos foram expostas por 24 horas aos extratos obtidos dos materiais em teste, tal como descrito anteriormente. Após este período, os extratos foram aspirados e as células mantidas em contato com MO, o qual foi substituído a cada 48 horas, até a realização das análises de atividade de ALP (14 dias) e deposição de nódulos de mineralização (21 dias).

- Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP, n=6): Após incubar as HDPCs em MO por 14 dias, a avaliação da atividade da enzima ALP foi realizada utilizando o protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest). Para isso, o MO foi aspirado e as células foram lisadas com 100 µL de lauril sulfato de sódio à 0,1% (Sigma-Aldrich) em temperatura ambiente durante 40 minutos. Após este período, uma alíquota de 50 µL do lisado de células foi transferida para uma placa de 48 poços (Kasvi), a qual foi previamente preparada com 10 µL de substrato (timolftaleína monofosfato; 22 mmol/L; reagente nº 1 do Kit) e 100 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10.1; reagente nº 2 do Kit) e pré-incubada por 15 minutos à 37°C. Após transferência

do lisado de células para a placa previamente preparada, foi realizada uma nova incubação por 15 minutos à 37°C. Em seguida, 400 µL de reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L; reagente nº 3 do Kit) foi adicionado às amostras. Então, duas alíquotas de 100 µL de cada amostra foram transferidas para nova placa de 96 compartimentos (Kasvi) para leitura da absorbância em espectrofotômetro à 590 nm (Synergy H1)^{6,112}.

Para normalização da atividade da enzima ALP, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelas células utilizando o método de Lowry a partir de uma curva padrão (0; 32; 64; 96; 128; 160 µg/mL). Inicialmente, uma alíquota de 25 µL da mesma amostra do lisado de células foi transferida para uma placa de 96 compartimentos (Kasvi). Em seguida, 50 µL de solução de reagente de Lowry (Sigma-Aldrich) foi adicionado à placa, a qual foi mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado 25 µL de solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma-Aldrich) na concentração 1:4 diluído em água destilada. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 655 nm (Synergy H1). A dosagem de ALP (µmol de timolftaleína/mim=U) foi calculada a partir de uma curva padrão pré-estabelecida com as concentrações de 0; 0,269; 1,333; 2,666; 4,000; 5,333; 6,666 U/L de ALP (Reagente nº 4; Fosfatase Alcalina; Labest). Os dados foram normalizados a partir da divisão do valor da dosagem de ALP pelo valor obtido da quantificação de proteínas totais, sendo expressos em U/µg^{6,112}. Ao final, os valores obtidos foram transformados em porcentagem, sendo o grupo controle negativo (G1) considerado como 100% de atividade de ALP⁶.

- Deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red, n=6): Após incubar as HDPCs em MO por 21 dias, foi realizada a avaliação da deposição de nódulos de mineralização, tal como descrito anteriormente no item 4.2.9.

4.4 Análise dos Dados

Para determinar se a dentina obtida de dentes bovinos pode ser uma alternativa adequada para substituir a DH em testes de citotoxicidade transdentinária, análises estatísticas comparativas entre os substratos dentinários para cada material avaliado foram realizadas. Para isso, inicialmente, os dados numéricos foram avaliados quanto

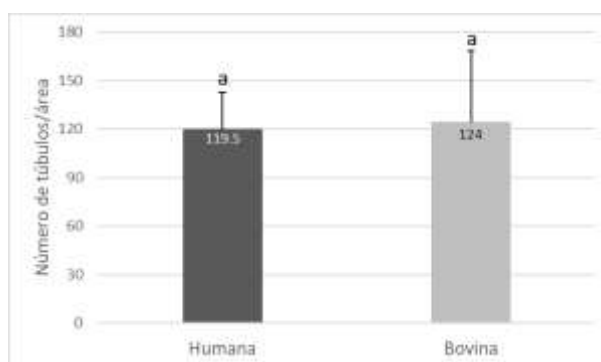
sua distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto a homogeneidade de variância dos grupos pelo teste de Levene. Diante da normalidade dos dados, estes foram avaliados pelo teste T student e teste ANOVA a um critério. Para identificação das diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste Tukey. Os dados de pH foram calculados com seus intervalos de confiança de 95%. Todos os testes foram fixados ao nível de significância de 5%. A análise qualitativa das imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) para análise de morfologia celular, bem como microscópio de fluorescência (Live/Dead e adesão/espalhamento celular) foi realizada, de tal forma que os dados obtidos foram fornecidos de maneira descritiva. Para verificar a reprodutibilidade dos dados, dois experimentos independentes foram realizados para todos os protocolos deste estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia dos Discos de DH e DB em MEV

Tal como observado na Figura 11, a DB apresentou quantidade de túbulos dentinários estatisticamente semelhante a DH ($p > 0,05$).

Figura 11 – Número de túbulos dentinários na DH e DB.

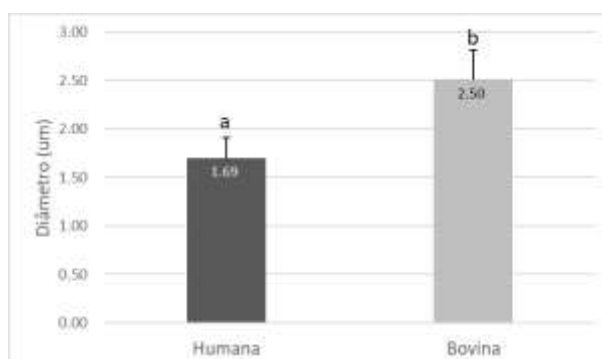


Média e desvio padrão do número de túbulos dentinários presentes nos discos de DH e DB por área. (Teste *T student*, $p = 0,8299$; $\alpha = 0,05$; e $n = 6$).

Fonte: Elaboração própria.

Tal como demonstrado na Figura 12, o diâmetro dos túbulos dentinários observados na superfície dos discos de DB foi significativamente maior do que nos discos de DH ($p < 0,05$).

Figura 12 - Diâmetro dos túbulos dentinários na DH e DB.

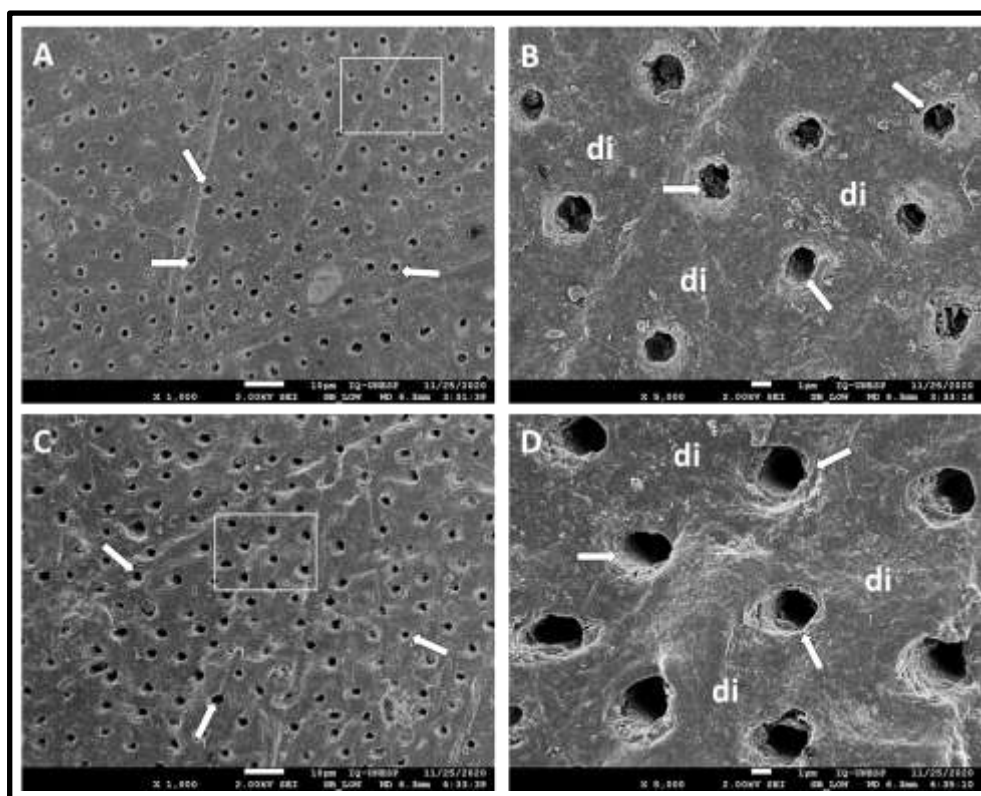


Média e desvio padrão do diâmetro de túbulos dentinários observado nos discos de DH e DB. (Teste *T student*, $p < 0,0001$; $\alpha = 0,05$; e $n = 30$).

Fonte: Elaboração própria.

Tanto a distribuição homogênea dos túbulos dentinários nas amostras de DB e DH, bem como o diâmetro destas estruturas que determinam o nível de permeabilidade do substrato, podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 – Análise da morfologia dos discos de DH e DB.



A) Superfície de uma amostra de DH, onde muitos túbulos dentinários são observados (setas). MEV, aumento original x1.000. B) Detalhe da área delimitada na imagem A. Note o diâmetro dos túbulos dentinários (setas), os quais estão homogêneamente presentes em meio a dentina intertubular (di). MEV, aumento original x5.000. C) Superfície de uma amostra de DB, onde o número e a distribuição homogênea dos túbulos dentinários (setas) são semelhantes à imagem A. MEV, aumento original x1.000. D) Túbulos dentinários (setas) com diâmetro maior do que aqueles observados na imagem B estão distribuídos entre a dentina intertubular (di). MEV, aumento original x5.000.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.2 Análise de pH dos Extratos Obtidos dos Materiais Resinosos

Os dados de pH dos extratos obtidos nos diferentes períodos de análise (imediato, 1 hora e 24 horas) estão apresentados na Figura 14. No período imediato, o pH dos extratos obtidos dos cimentos resinosos RelyX Luting 2 e RelyX Ultimate foi de 6,2 e 7,8, respectivamente, sendo que estes valores foram estatisticamente

diferentes do grupo controle (pH=8,4; $p<0,05$). No período de 1 hora, os valores de pH dos materiais resinosos Single Bond Universal; RelyX U200; RelyX Ultimate; e RelyX Luting 2 foram de 7,8; 8,1; 7,6; e 5,8, respectivamente. Nesse período de análise, todos os extratos apresentaram pH inferior ao grupo controle (pH=8,5; $p<0,05$). No período de 24 horas, apenas o CIVMR RelyX Luting 2 exibiu redução no valor de pH (5,7) em comparação aos extratos dos demais materiais, os quais permaneceram básicos (pH acima de 8,0).

Figura 14 – Análise de pH dos extratos

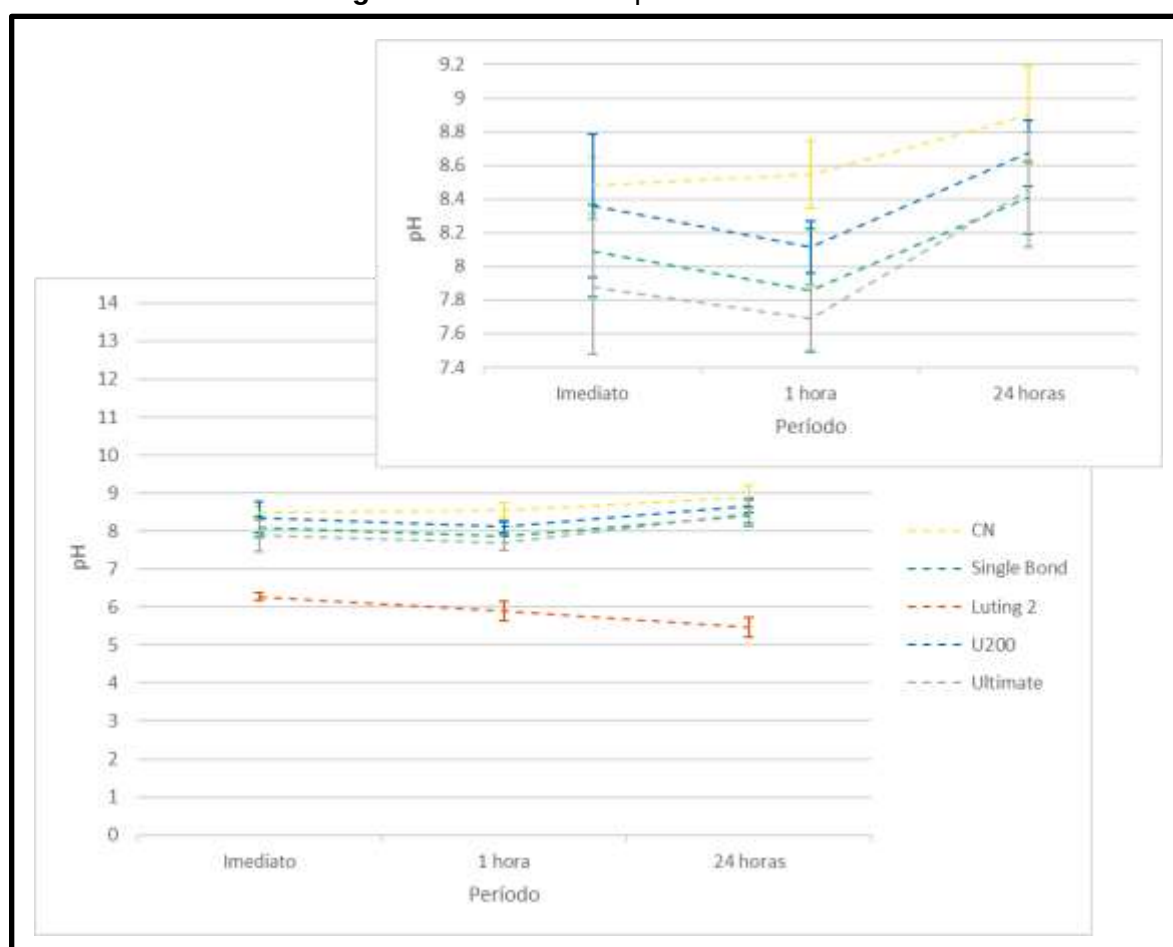


Gráfico de linhas representativo da alteração de pH dos extratos obtidos dos materiais resinosos. Pontos representam valores médios de pH nos determinados momentos e barras de erro indicam intervalos de confiança (IC 95%).

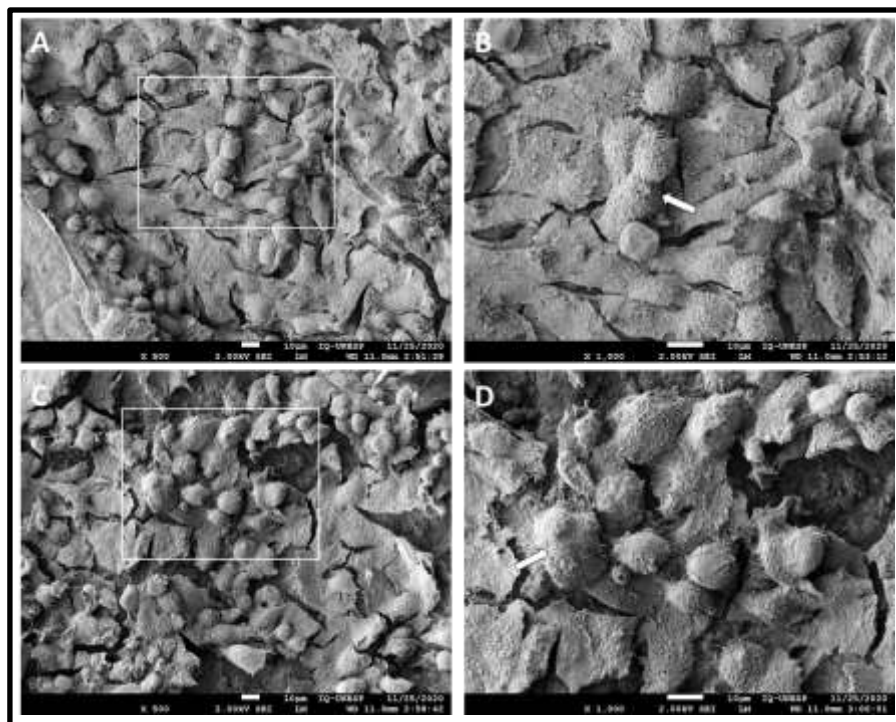
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Citotoxicidade Transdentinária de Materiais Utilizados para Cimentação de Peças Protéticas (MDPC-23).

5.3.1 Morfologia das células cultivadas sobre dentina (MEV; n=2)

Grande quantidade de células odontoblastóides MDPC-23 aderidas na superfície pulpar dos discos de DH e DB foi observado nos grupos controle G1 e G2, onde nenhum material foi aplicado sobre a superfície oclusal das amostras montados nas CPAs (Figura 15). Os substratos obtidos dos dentes humanos e bovinos estavam recobertos por células com amplo citoplasma, do qual se originavam muitos prolongamentos finos e curtos (Figura 15). Estas características determinaram que o espalhamento das células MDPC-23 sobre o substrato dentinário foi homogêneo tanto para a DH quanto para a DB.

Figura 15 - Fotomicrografias representativas dos grupos G1 e G2

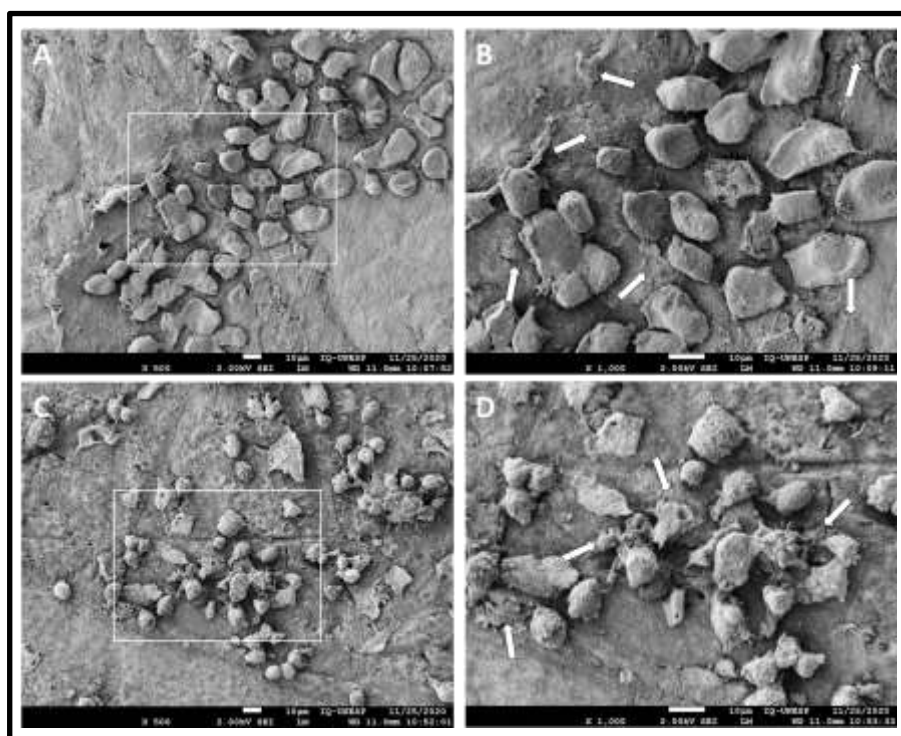


A) Superfície pulpar de um disco de DH, onde numerosas células recobrem praticamente todo substrato. MEV, aumento original x500. B) Detalhe da área demarcada na imagem A. Note que as células MDPC-23 exibem amplo citoplasma, do qual surgem numerosos prolongamentos curtos. A seta demonstra células em fase final de mitose. MEV aumento original x1.000. C) Superfície pulpar de um disco de DB, onde numerosas células recobrem praticamente todo substrato dentinário. MEV, aumento original x500. D) Detalhe da área demarcada na imagem C. Note que as células MDPC-23 exibem amplo citoplasma, do qual surgem numerosos prolongamentos curtos. A seta demonstra células em fase precoce de mitose. MEV, aumento original x1.000.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Nos grupos controle positivos G3 e G4, onde a superfície oclusal dos discos de DH e DB, respectivamente, foi tratada com o sistema adesivo Single Bond Universal, intensa redução na quantidade de células que permaneceram aderidas ao substrato foi observado. Desta forma, amplas áreas de dentina com restos de células mortas que se deslocaram do substrato, foram observadas (Figura 16). As poucas células MDPC-23 que ainda se mantiveram sobre a dentina exibiam contração de citoesqueleto, o que ocasionou redução de tamanho em comparação aos seus respectivos controles (G1 e G2). A membrana citoplasmática das células praticamente não emite prolongamentos (Figura 16 B/D), tal como observado nas células dos grupos controle. Apesar das extensas áreas de DH e DB expostas, as imagens obtidas em MEV demonstraram que as células haviam se espalhado homogeneamente em ambos os substratos.

Figura 16 - Fotomicrografias representativas dos grupos G3 e G4

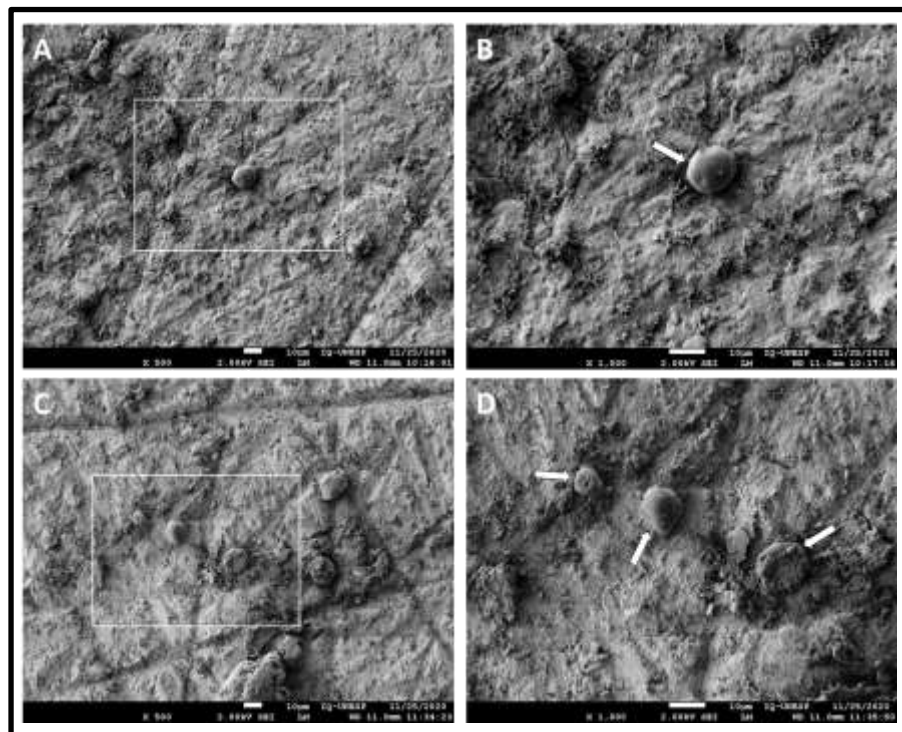


A) Superfície pulpar de um disco de DH, onde poucas células permaneceram aderidas ao substrato. MEV, aumento original x500. B) Detalhe da área demarcada na imagem A, onde células MDPC-23 exibem citoplasma contraído e praticamente sem prolongamentos. As setas demonstram restos de células mortas sobre a dentina. MEV, aumento original x1.000. C) Superfície pulpar de um disco de DB, onde reduzido número de células permaneceram aderidas ao substrato. MEV, aumento original x500. D) Detalhe da área demarcada na imagem C. Note que as várias células que permaneceram aderidas ao substrato exibem grave ruptura da membrana citoplasmática (setas). MEV, aumento original x1.000.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Nos grupos G5 e G6, onde o cimento RelyX Luting 2 foi aplicado nos discos de DH e DB, respectivamente, foi possível observar redução drástica na quantidade de células odontoblastóides MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato. Fragmentos do citoplasma de células mortas revestiam grande parte da dentina, demonstrando que após realizar o cultivo, as células se espalharam pela superfície pulpar dos discos de DH e DB. Porém, após a aplicação do cimento RelyX Luting 2 na superfície oclusal das amostras, o efeito tóxico transdentinário foi intenso, caracterizado por ampla lesão celular irreversível (Figura 17).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas dos grupos G5 e G6

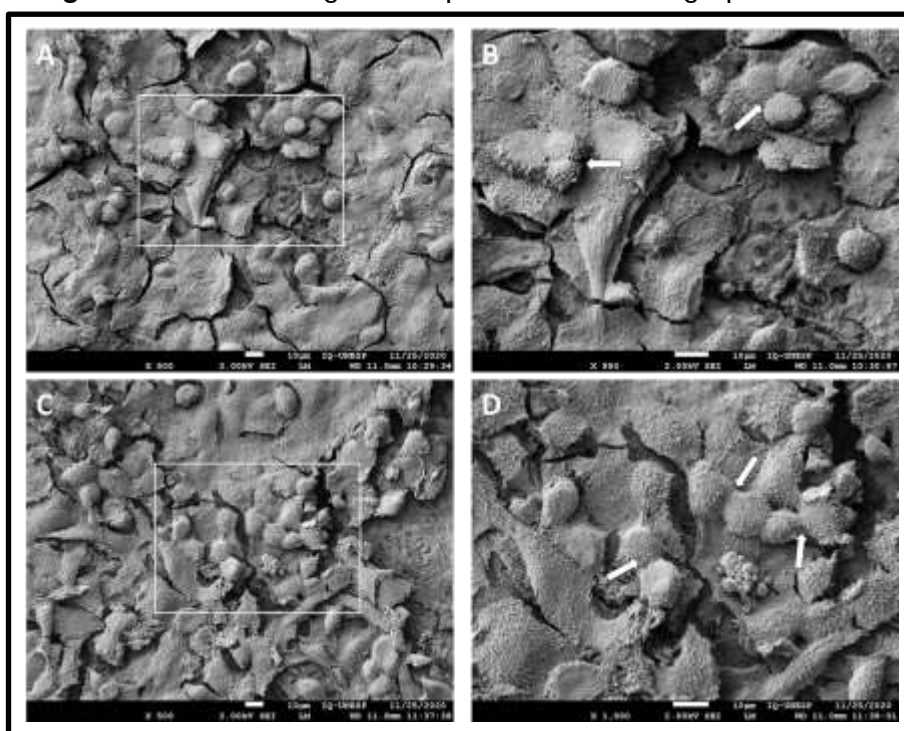


A) Superfície pulpar de um disco de DH, onde apenas algumas poucas células permaneceram aderidas ao substrato. MEV, aumento original x500. B) Detalhe da área demarcada na imagem A. Note a presença de uma célula MDPC-23 contraída e com morfologia arredondada, a qual não emite prolongamentos (seta). Ampla área de dentina foi recoberta por restos de células mortas que se destacaram do substrato. MEV, aumento original x1.000. C) Superfície pulpar de um disco de DB, onde poucas células permaneceram aderidas ao substrato dentinário. MEV, aumento original x500. D) Detalhe da área demarcada na imagem C. Note que poucas células MDPC-23 com morfologia arredondada, citoplasma liso e sem prolongamentos (setas), permaneceram sobre a superfície pulpar do disco. MEV, aumento original x1.000.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Nos grupos G7 e G8, onde o cimento RelyX U200 foi aplicado sobre a superfície oclusal dos discos de DH e DB, respectivamente, foi observado que uma elevada quantidade de células MDPC-23 permaneceu aderidas na superfície pulpar das amostras (Figura 18). Estas células não exibiam importante alteração morfológica quando comparadas aos seus respectivos grupos controles G1 e G2. O padrão de adesão e espalhamento das células sobre o substrato dentinário foi semelhante para os discos de DH e DB.

Figura 18 - Fotomicrografias representativas dos grupos G7 e G8



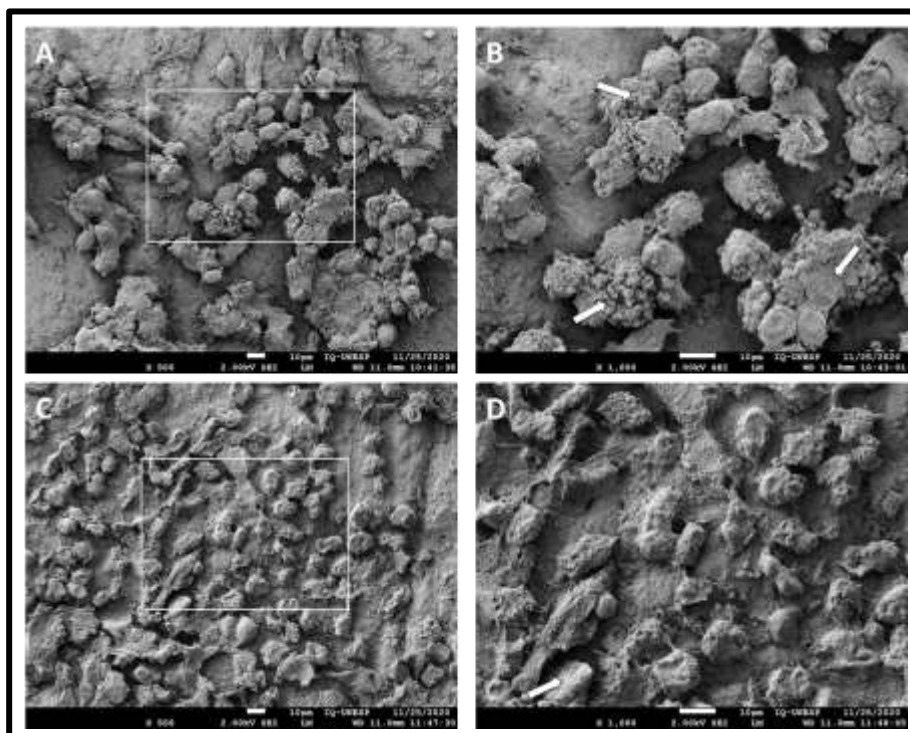
A) Superfície pulpar de um disco de DH, onde numerosas células recobrem praticamente todo substrato. MEV, aumento original x500. B) Detalhe da área demarcada na imagem A. Note que as células MDPC-23 exibem amplo citoplasma, do qual surgem numerosos prolongamentos curtos. A seta demonstra células em fase final de mitose. MEV, aumento original x1.000. C) Superfície pulpar de um disco de DB, onde numerosas células recobrem praticamente todo substrato. MEV, aumento original x500. D) Detalhe da área demarcada na imagem C. Note que as células MDPC-23 exibem amplo citoplasma, do qual surgem numerosos prolongamentos curtos. A seta demonstra células em fase precoce de mitose. MEV, aumento original x1.000.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após aplicação do cimento RelyX Ultimate sobre os discos de DH e DB (G9 e G10, respectivamente), uma menor quantidade de células odontoblastóides MDPC-23 permaneceram aderidas ao substrato em comparação aos controles G1 e G2

(Figura 19). Células contraídas e com morfologia arredondada foram observadas sobre a dentina em ambos os grupos. Apesar de grande parte das células aderidas ao substrato ainda apresentarem citoplasma evidente e prolongamentos curtos originados de sua superfície, estas células pareciam estar dispersas na DB, enquanto que para a DH elas estavam organizadas em nódulos epitelióides.

Figura 19 - Fotomicrografias representativas dos grupos G9 e G10



A) Superfície pulpar de um disco de DH, onde muitas células organizadas em nódulos epitelióides recobrem grande parte do substrato. MEV, aumento original x500. B) Detalhe da área demarcada na imagem A. Muitas células MDPC-23 organizadas em nódulos (setas) exibem amplo citoplasma, do qual surgem alguns prolongamentos curtos; todavia, áreas da dentina exposta determinam que parte das células semeadas na superfície foram letalmente agredidas após aplicação do cimento e assim se desprenderam do substrato. MEV, aumento original x1.000. C) Superfície pulpar de um disco de DB, onde numerosas células permaneceram aderidas ao substrato. MEV, aumento original x500. D) Detalhe da área demarcada na imagem C. Note que as células MDPC-23, as quais estão espalhadas sobre a dentina, exibem amplo citoplasma, do qual surgem numerosos prolongamentos curtos. MEV, aumento original x1.000.

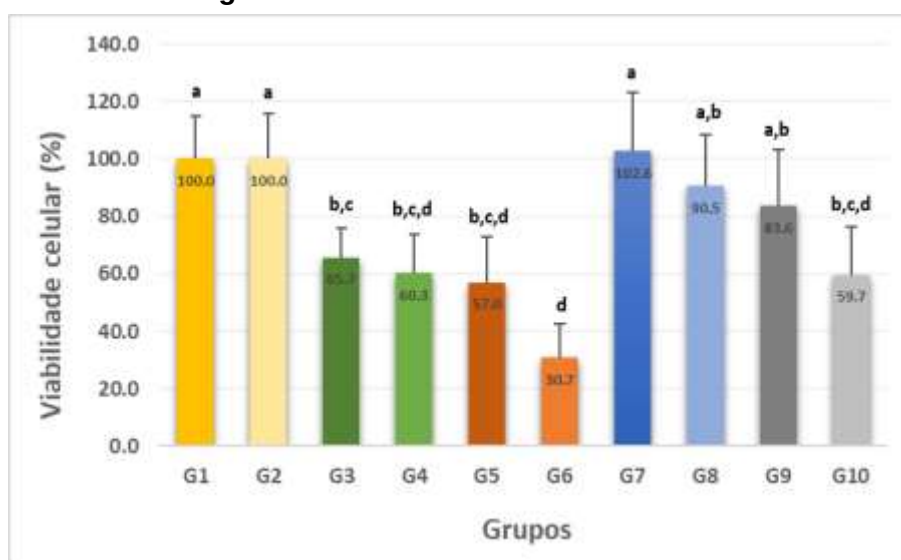
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.3.2 Viabilidade das células MDPC-23 sobre dentina (AlamarBlue; n=6)

Os dados de viabilidade celular estão apresentados na Figura 20. Redução significativa da viabilidade celular ocorreu nos grupos controles positivos (G3 e G4),

onde o sistema adesivo Single Bond Universal foi aplicado sobre DH e DB, bem como nos grupos do cimento RelyX Luting 2 (G5 e G6), em comparação aos seus respectivos controles negativos (G1 e G2; $p < 0,05$). A aplicação do cimento RelyX Ultimate sobre a superfície oclusal dos discos de dentina (G9 e G10) reduziu significativamente a viabilidade celular apenas para a DB (G10) quando comparado ao seu respectivo controle negativo (G2; $p < 0,05$). De maneira geral, ao comparar os demais materiais resinosos individualmente aplicados sobre DH e DB, não foi identificado diferença significativa entre a origem do substrato ($p > 0,05$).

Figura 20 – Análise da viabilidade celular



Média e desvio padrão dos valores de viabilidade das células odontoblastóides MDPC-23 pelo ensaio de AlamarBlue. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (ANOVA/Tukey, $\alpha = 0,05$; e $n = 6$).

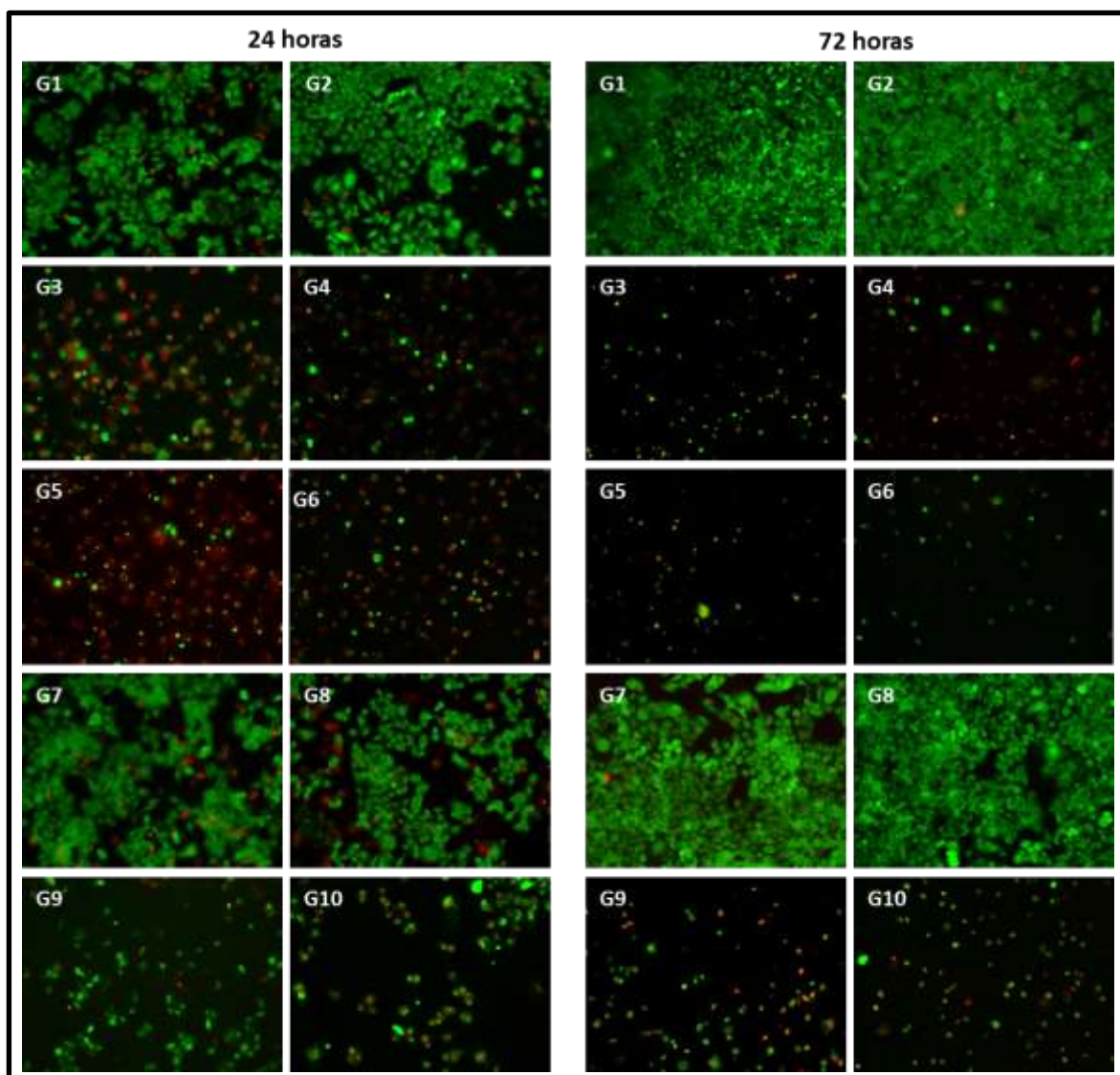
Fonte: Elaboração própria.

5.3.3 Viabilidade das células MDPC-23 expostas aos extratos (Live/Dead; $n = 4$)

Em ambos os períodos de análise (24 e 72 horas), redução na quantidade de células vivas (verde) e maior número de células mortas (vermelho) foi observado quando os extratos do sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e dos cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6) e RelyX Ultimate (G9 e G10) foram obtidos de discos de DH e DB (Figura 21). Maior quantidade de células vivas estava presente nos grupos controle G1 e G2 e quando o cimento RelyX U200 (G7 e G8) foi usado,

tanto para DH quanto em DB. Nesses grupos, maior quantidade de células vivas foi observada no período de 72 horas em comparação a 24 horas (Figura 21).

Figura 21 – Análise de Live/Dead

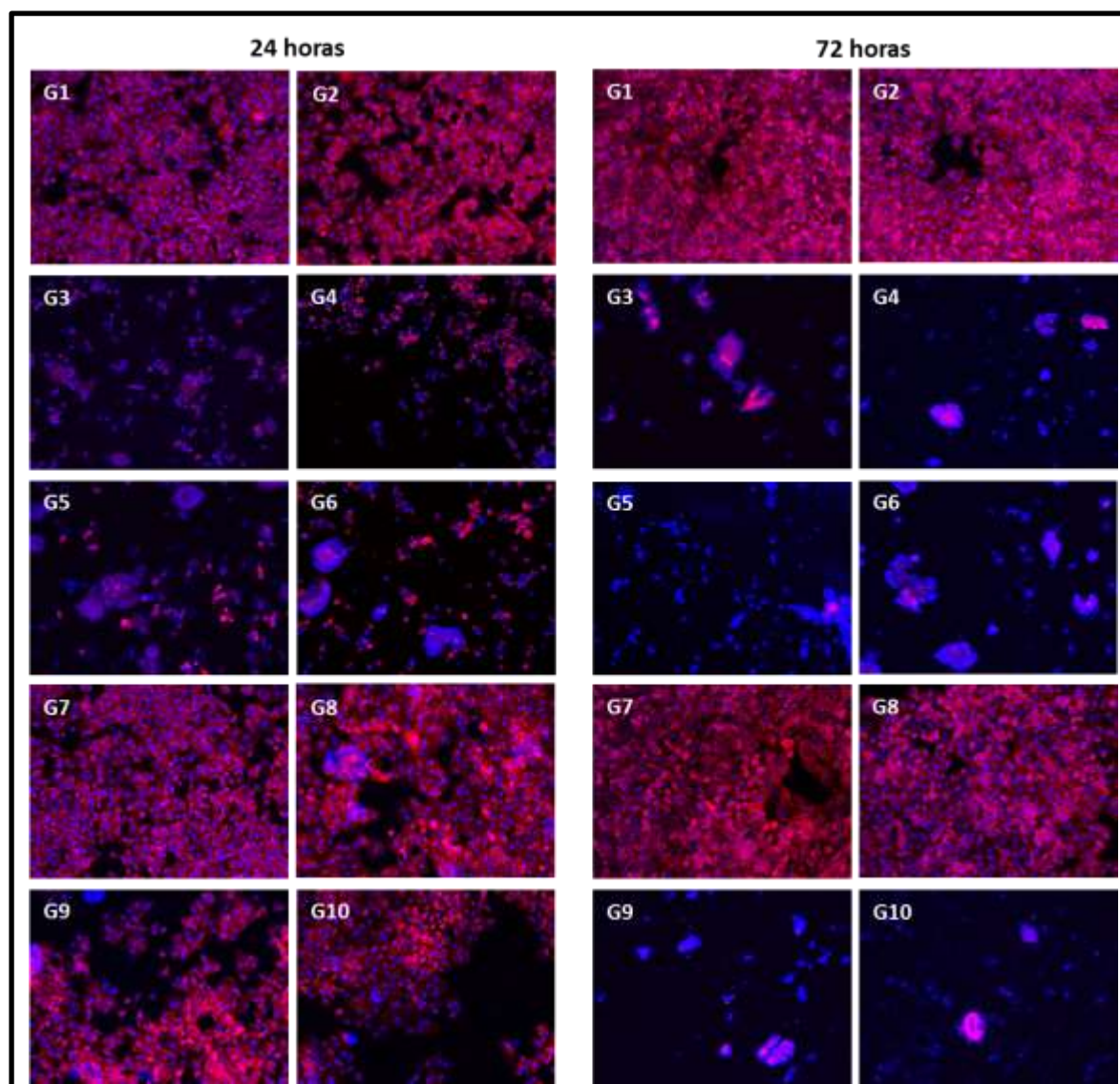


G1 e G2 – DH e DB sem tratamento, respectivamente; G3 e G4 – DH e DB tratadas com o sistema adesivo Single Bond Universal, respectivamente; G5 e G6 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Luting 2, respectivamente; G7 e G8 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX U200, respectivamente; G9 e G10 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Ultimate, respectivamente. As células MDPC-23 que se mantiveram vivas após serem expostas aos extratos estão coradas em verde, sendo que as células mortas estão evidenciadas em vermelho (aumento original x10).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.3.4 Adesão/espalhamento das células MDPC-23 expostas aos extratos (F-actina; n=4)

Os resultados de adesão e espalhamento celular das células MDPC-23 expostas aos extratos obtidos dos materiais em teste estão demonstrados na Figura 22. Reduzida quantidade de células ocorreu nos grupos onde foram aplicados o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e os cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6) e RelyX Ultimate (G9 e G10) nos discos de DH e DB, sendo esta redução mais evidente no período de 72 horas. Nos grupos G9 e G10 (RelyX Ultimate), um maior número de células permaneceu aderido ao substrato no período de 24 horas em comparação à G3, G4, G5 e G6. Os grupos controles G1 e G2, bem como àqueles onde o cimento RelyX U200 (G7 e G8) foi usado, exibiram maior quantidade de células aderidas em ambos os períodos de análise. De maneira geral, a avaliação individual de cada material aplicado sobre DH e DB, permitiu determinar que o padrão de adesão e espalhamento das células expostas aos extratos foi semelhante, independente da origem do substrato.

Figura 22 – Análise de adesão e espalhamento celular

G1 e G2 – DH e DB sem tratamento, respectivamente; G3 e G4 – DH e DB tratadas com o sistema adesivo Single Bond Universal, respectivamente; G5 e G6 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Luting 2, respectivamente; G7 e G8 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX U200, respectivamente; G9 e G10 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Ultimate, respectivamente. O núcleo e o citoesqueleto das células MDPC-23 estão evidenciados em azul e vermelho, respectivamente (aumento original x10).

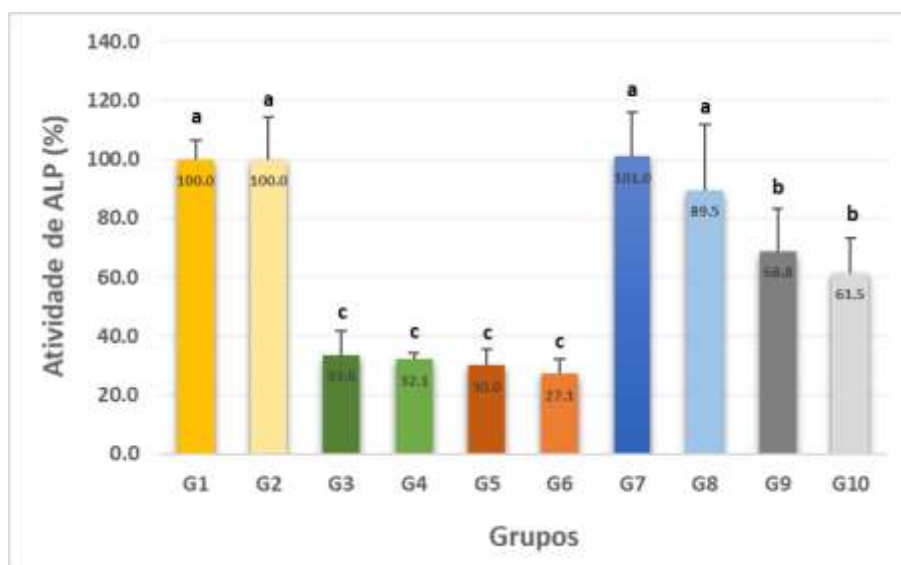
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.3.5 Expressão fenotípica das células MDPC-23 expostas aos extratos (n=6)

- Atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP): Os dados de atividade de ALP estão demonstrados na Figura 23. Apenas os grupos onde o cimento RelyX U200 foi usado (G7 e G8) apresentaram valores da atividade de ALP similar aos seus respectivos controles (G1 e G2), independente da origem do substrato dentinário onde o cimento

foi aplicado ($p>0,05$). Redução da atividade de ALP foi observado quando a DH e DB receberam a aplicação do sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e dos cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6) e RelyX Ultimate (G9 e G10), quando comparados aos seus respectivos controles (G1 e G2; $p<0,05$). De maneira geral, não foi determinada diferença significativa na atividade de ALP pelas células MDPC-23 quando um mesmo material foi aplicado sobre a DH e DB ($p>0,05$).

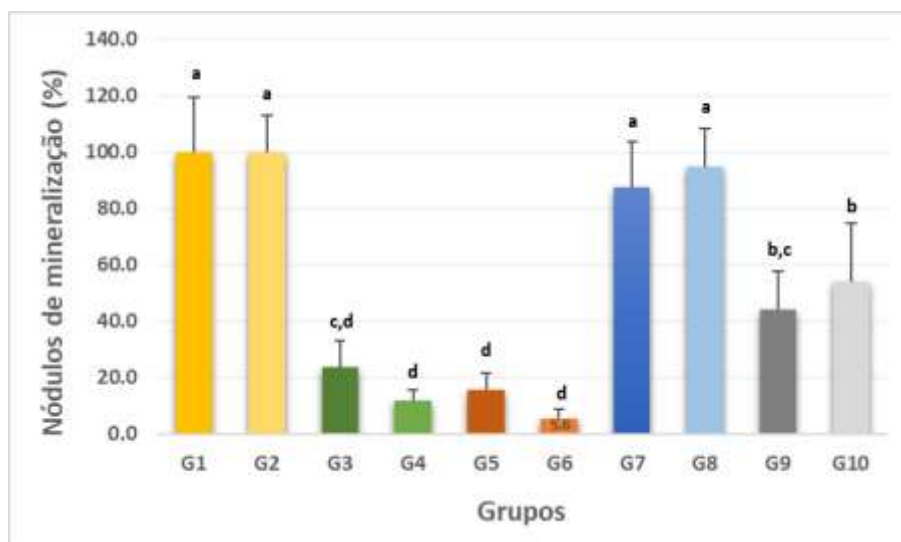
Figura 23 – Atividade de ALP



Média e desvio padrão dos valores de atividade da enzima ALP pelas células odontoblastóides MDPC-23. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (ANOVA/Tukey, $\alpha=0,05$; $n=6$).

Fonte: Elaboração própria.

- Deposição de nódulos de mineralização (NM): Os valores, em porcentagem, da deposição de NM pelas células MDPC-23 expostas aos extratos de cada grupo estabelecido neste estudo, estão demonstrados na Figura 24. Redução significativa na deposição de NM ocorreu nos grupos onde foram usados o agente adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e os cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6) e RelyX Ultimate (G9 e G10), independente da origem dos discos de dentina sobre os quais os materiais foram aplicados ($p<0,05$). Apenas os grupos onde o cimento RelyX U200 foi usado (G7 e G8), apresentaram valor de absorbância referente à deposição de NM semelhante aos seus respectivos controles (G1 e G2; $p>0,05$).

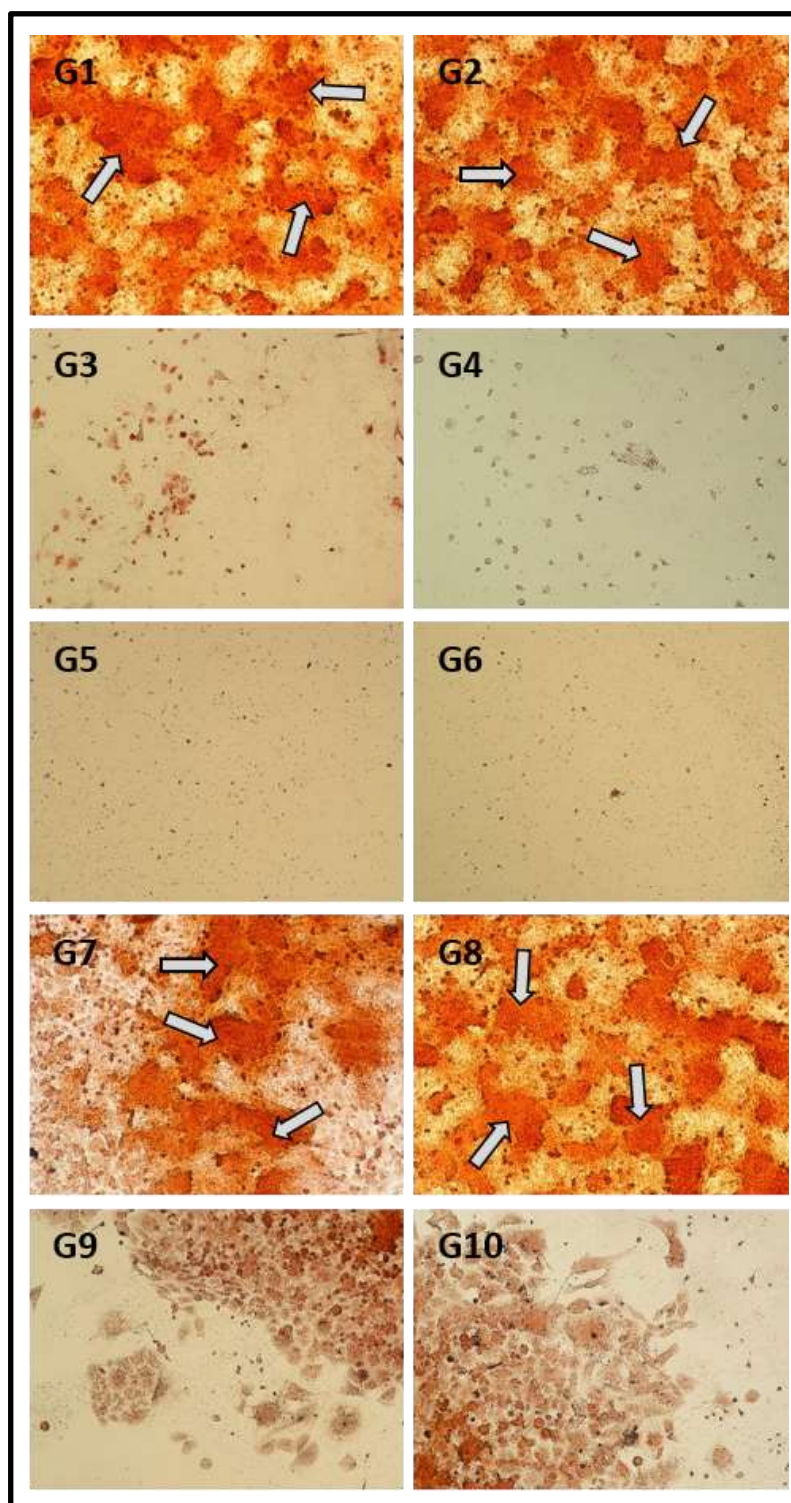
Figura 24 – Nódulos de mineralização

Média e desvio padrão dos valores de absorbância relativos à deposição de nódulos de mineralização pelas células odontoblastóides MDPC-23. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (ANOVA/Tukey, $\alpha=0,05$; $n=6$).

Fonte: Elaboração própria.

As imagens obtidas por microscopia de luz dos NM aderidos ao substrato estão apresentadas na Figura 25. De maneira geral, não foi observado diferença no padrão de formação dos NM pelas células MDPC-23 expostas aos extratos de um mesmo material, quando discos de DH e DB foram usados como barreiras permeáveis. Entretanto, foi possível determinar que o padrão e a quantidade de NM formados foram influenciados pelo tipo de material resinoso avaliado neste estudo. Apenas as células expostas aos extratos obtidos do cimento RelyX U200 (G7 e G8) apresentaram deposição de NM semelhante aos seus respectivos controles (G1 e G2).

Figura 25 - Imagens de deposição de NM pelas células MDPC-23



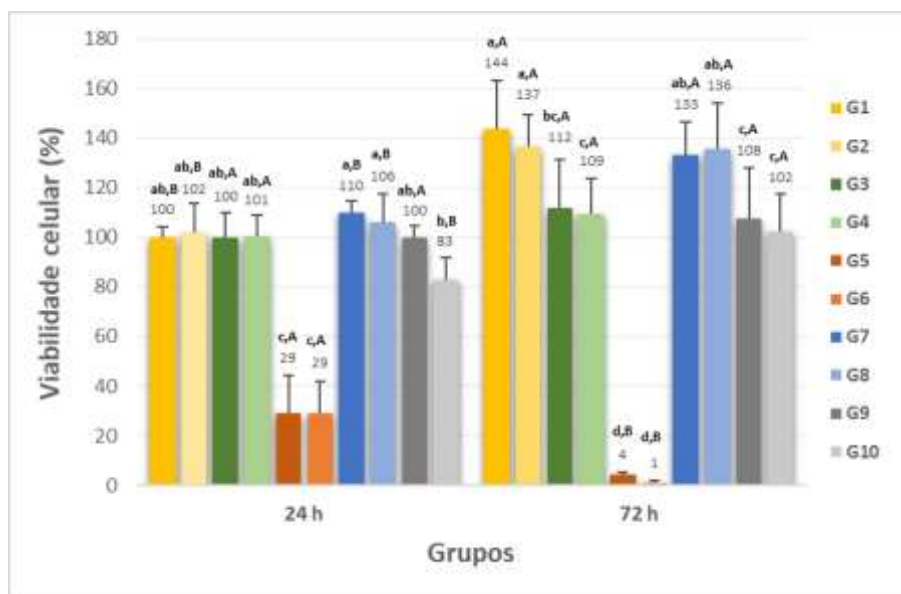
Nenhum tratamento na DH (G1) e DB (G2); aplicação do sistema adesivo Single Bond Universal na DH (G3) e DB (G4); aplicação do cimento RelyX Luting 2 na DH (G5) e DB (G6); aplicação do cimento RelyX U200 na DH (G7) e DB (G8); e aplicação do cimento RelyX Ultimate na DH (G9) e DB (G10). Os nódulos de mineralização formados pelas células MDPC-23 estão evidenciados em vermelho (setas) nas imagens (aumento original x10).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4 Citotoxicidade Transdentinária dos Extratos dos Materiais Utilizados para Cimentação de Peças Protéticas (HDPCs).

5.4.1 Citotoxicidade dos extratos sobre as HDPCs (AlamarBlue; n=6)

Os dados de citotoxicidade foram definidos com base na porcentagem de viabilidade das células expostas aos extratos obtidos para cada grupo estabelecido no presente estudo (Figura 26). No período de 24 horas, ocorreu redução da viabilidade celular nos grupos onde o cimento RelyX Luting 2 foi aplicado sobre os discos de DH e DB (G5 e G6), em comparação aos respectivos controles negativos (G1 e G2; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos onde o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e os cimentos RelyX U200 (G7 e G8) e RelyX Ultimate (G9 e G10) foram usados, quando comparados aos grupos controles negativos (G1 e G2; $p > 0,05$). No período de 72 horas, os grupos G5 e G6 apresentaram menor viabilidade celular quando comparados ao período anterior. Aumento da viabilidade celular ocorreu nos grupos G1, G2, G7, G8, G9 e G10, sendo que os grupos G3 e G4 não mostraram diferença quando ambos os períodos foram comparados ($p < 0,05$). A análise comparativa de cada material aplicado sobre DH e DB, demonstrou que a origem dos substratos e os períodos de 24 e 72 horas não influenciaram os efeitos citotóxicos ($p > 0,05$).

Figura 26 - Viabilidade das HDPCs

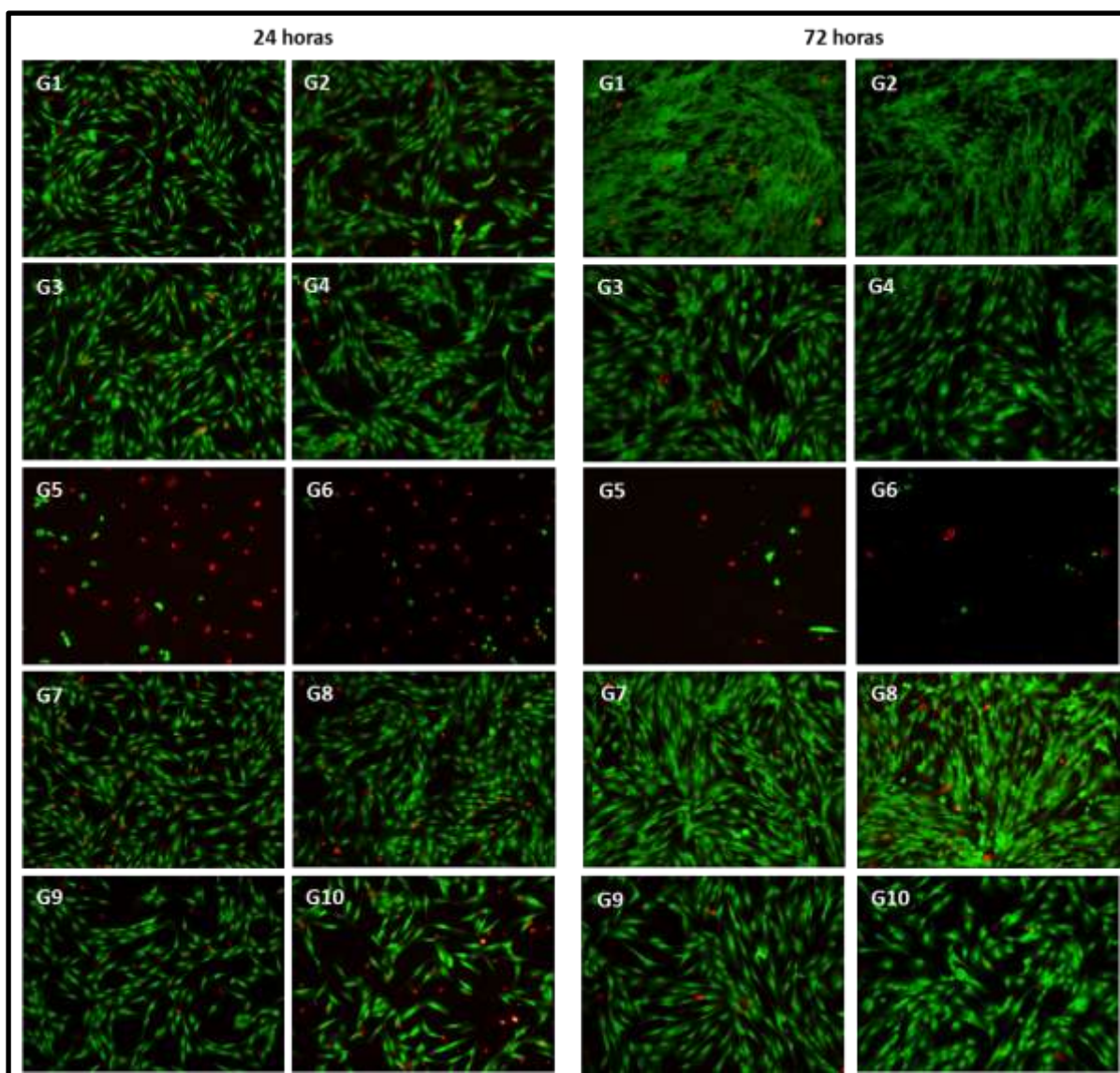
Média e desvio padrão dos valores (%) de viabilidade celular (n=6; ANOVA two-way/Tukey; $\alpha=0,05$). Diferentes letras minúsculas demonstram diferença significativa entre os grupos dentro de cada período de análise. Diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os períodos de análise para cada grupo.

Fonte: Elaboração própria.

5.4.2 Viabilidade das HDPCs expostas aos extratos (Live/Dead; n=4)

Em ambos os períodos de análise (24 e 72 horas), redução na quantidade de células vivas (verde) e maior quantidade de células mortas (vermelho) foi observado quando o cimento RelyX Luting 2 foi aplicado sobre os discos de DH e DB (G5 e G6). Maior quantidade de células vivas estava presente nos grupos G1 e G2 e quando os extratos obtidos do sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e dos cimentos RelyX U200 (G7 e G8) e RelyX Ultimate (G9 e G10) foram aplicados sobre DH e DB. Nos grupos G1, G2, G7 e G8 foi observado maior quantidade de células vivas no período de 72 horas em comparação ao período de 24 horas. Esses dados de viabilidade celular estão apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Imagens de Live/Dead



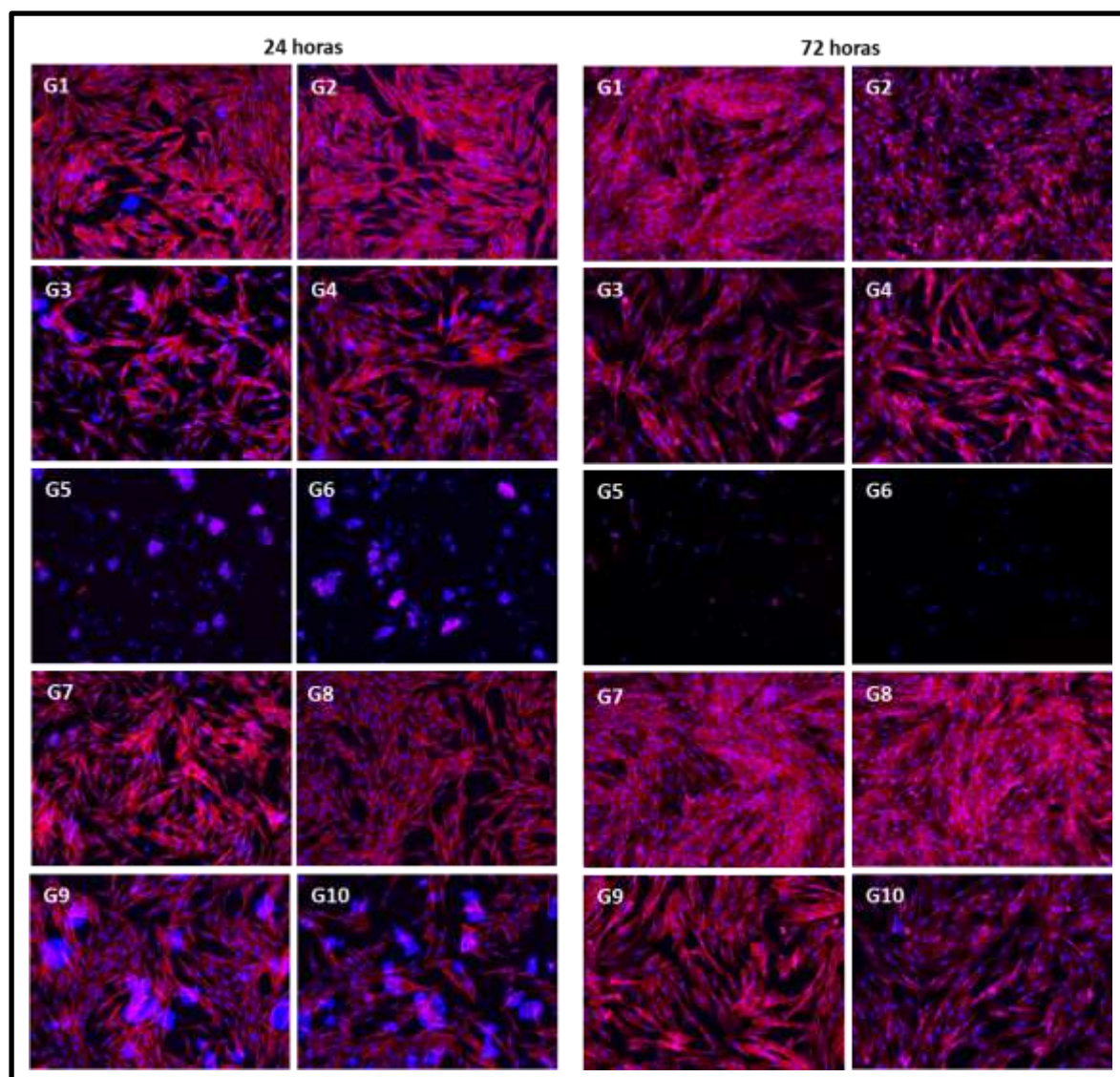
G1 e G2 – DH e DB sem tratamento, respectivamente; G3 e G4 – DH e DB tratadas com o sistema adesivo Single Bond Universal, respectivamente; G5 e G6 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Luting 2, respectivamente; G7 e G8 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX U200, respectivamente; G9 e G10 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Ultimate, respectivamente. As HDPCs que se mantiveram vivas após serem expostas aos extratos estão coradas em verde, sendo que as células mortas estão evidenciadas em vermelho (aumento original x10).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4.3 Adesão/espalhamento das HDPCs expostas aos extratos (F-actina; n=4)

Os resultados de adesão e espalhamento das HDPCs cultivadas sobre os substratos e expostas aos extratos obtidos para todos os grupos estão demonstrados na Figura 28. Redução na quantidade de células aderidas ocorreu nos grupos G5 e

G6, onde o cimento RelyX Luting 2 foi aplicado sobre os discos de DH e DB, respectivamente, sendo este achado mais evidente no período de 72 horas. Os grupos G1 e G2 (CN) foram àqueles que apresentaram o maior número de HDPCs sobre o substrato em ambos os períodos de análise. Discreta redução na quantidade de HDPCs ocorreu nos grupos G3, G4, G7, G8, G9 e G10, os quais exibiram semelhanças quanto ao espalhamento das células sobre os substratos nos períodos de 24 e 72 horas. A análise individual de cada material aplicado sobre os discos de DH e DB, permitiu determinar que o padrão de adesão e espalhamento das células expostas aos extratos foi semelhante, independente da origem do substrato.

Figura 28 - Análise de adesão e espalhamento das células HDPCs

G1 e G2 – DH e DB sem tratamento, respectivamente; G3 e G4 – DH e DB tratadas com o sistema adesivo Single Bond Universal, respectivamente; G5 e G6 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Luting 2, respectivamente; G7 e G8 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX U200, respectivamente; G9 e G10 – DH e DB tratadas com o cimento RelyX Ultimate, respectivamente. O núcleo e o citoesqueleto das células HDPCs estão evidenciados em azul e vermelho, respectivamente (aumento original x10).

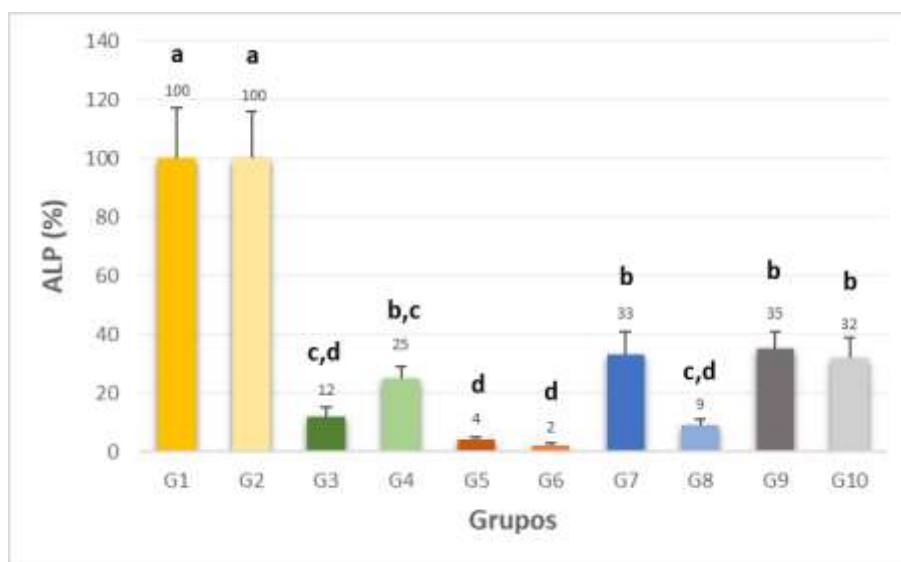
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4.4 Expressão fenotípica das HDPCs expostas aos extratos (n=6)

- Atividade de fosfatase alcalina (ALP): Menor atividade de ALP foi observada quando os discos de DH e DB receberam aplicação do adesivo Single Bond Universal (G3 e G4), cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6), RelyX U200 (G7 e G8) e RelyX Ultimate (G9 e G10), em comparação aos respectivos grupos controle (G1 e G2; $p < 0,05$). Nos

grupos G7 e G8, onde o cimento RelyX U200 foi aplicado sobre DH e DB, respectivamente, a atividade da enzima ALP foi menor quando o substrato bovino (G8) foi usado ($p<0,05$). Os dados de atividade de ALP estão apresentados na Figura 29.

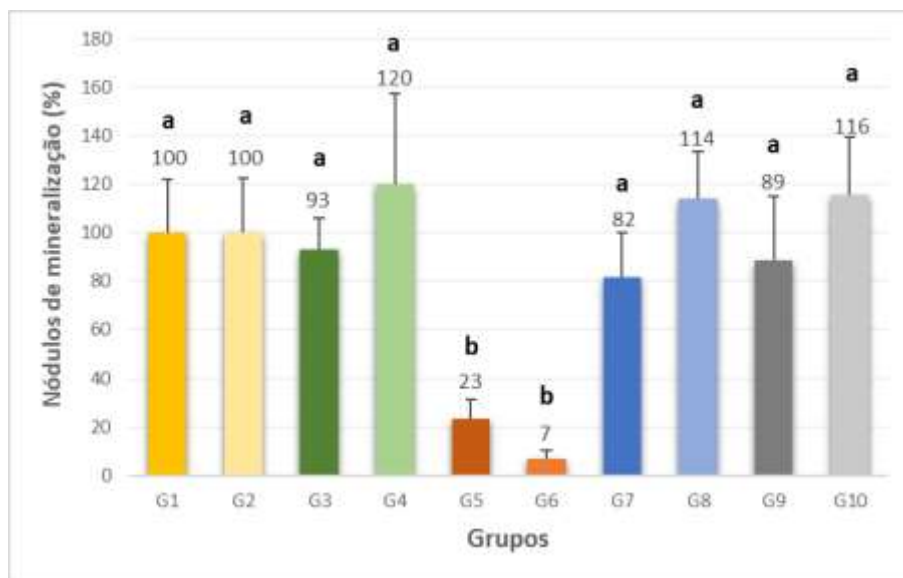
Figura 29 – Atividade de ALP



Média e desvio padrão dos valores de atividade da enzima ALP pelas células HDPCs. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (ANOVA/Tukey, $\alpha=0,05$; $n=6$).

Fonte: Elaboração própria.

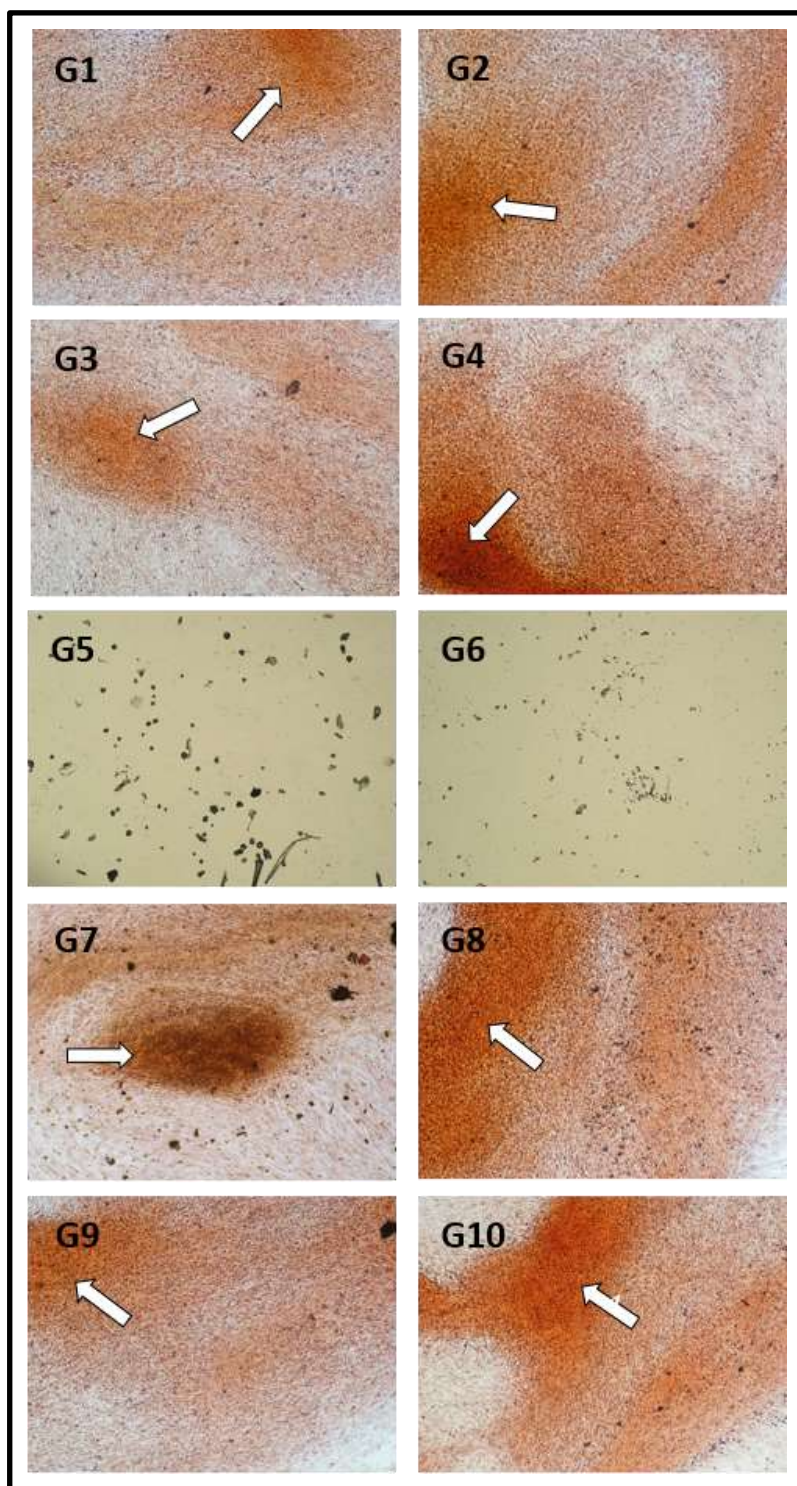
- Deposição de nódulos de mineralização (NM): Significativa queda na deposição de NM ocorreu para ambos os substratos (DH e DB) quando estes receberam a aplicação do cimento RelyX Luting 2 (G5 e G6;) se comparados aos demais grupos ($p<0,05$). Os grupos onde foram usados o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4) e os cimentos RelyX U200 (G7 e G8) e RelyX Ultimate (G9 e G10) não foram diferentes de seus respectivos controles (G1 e G2; $p>0,05$). Não foi observada diferença estatística quando um mesmo material foi aplicado sobre os diferentes substratos ($p>0,05$). Os dados de NM, os quais estão demonstrados na Figura 30, foram corroborados pelas imagens obtidas das células submetidas ao ensaio de Alizarin Red (Figura 31).

Figura 30 – Nódulos de mineralização

Média e desvio padrão dos valores de absorvância relativos à deposição de nódulos de mineralização pelas células HDPCs. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si (ANOVA/Tukey, $\alpha=0,05$; $n=6$).

Fonte: Elaboração própria.

As imagens obtidas por microscopia de luz dos NM depositados pelas HDPCs e que permaneceram aderidos ao substrato estão apresentadas na Figura 31. De maneira geral, não foi observado diferença no padrão de formação dos NM pelas células expostas aos extratos de um mesmo material, independente da origem dos discos de dentina. Entretanto, foi possível determinar que o padrão de distribuição dos NM formados foram influenciados pelo tipo de material resinoso avaliado neste estudo. Apenas as células expostas aos extratos obtidos do cimento RelyX Luting 2 (G5 e G6) não apresentaram deposição de NM semelhante aos seus respectivos grupos controle (G1 e G2).

Figura 31 - Deposição de NM pelas HDPCs

Nenhum tratamento na DH (G1) e DB (G2); aplicação do sistema adesivo Single Bond Universal na DH (G3) e DB (G4); aplicação do cimento RelyX Luting 2 na DH (G5) e DB (G6); aplicação do cimento RelyX U200 na DH (G7) e DB (G8); e aplicação do cimento RelyX Ultimate na DH (G9) e DB (G10). Os nódulos de mineralização formados pelas HDPCs e que aparecem dispersos pelo substrato, estão evidenciados por setas nas imagens representativas de todos os grupos (aumento original x10).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

Os protocolos laboratoriais empregados neste estudo têm sido amplamente usados para mimetizar, *in vitro*, situações clínicas pontuais^{11,21,39,40}. Na presente investigação, foi tentado simular uma situação clínica desafiadora para as células pulpares, uma vez que os materiais dentários (cimentos resinosos e sistema adesivo) foram aplicados na superfície oclusal de discos de DH e DB com apenas 0,4 mm de espessura^{39,74}. Entretanto, a validação da possibilidade de substituir dentina humana por bovina ainda não havia sido realizada para testes de citotoxicidade transdentinária, sendo esse, então, um dos principais objetivos dessa pesquisa.

Dentro deste contexto metodológico, a possibilidade de difusão transdentinária de componentes liberados de materiais dentários se torna evidente, e desta maneira seus efeitos tóxicos sobre células da polpa podem ser avaliados e comparados^{21,39,40}. Consequentemente, esse protocolo de desafio biológico máximo também foi usado no presente estudo para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos de diferentes materiais resinosos usados na prática clínica para cimentação de restaurações indiretas e peças protéticas. Este segundo objetivo principal da presente investigação pode ajudar a definir, guardando os devidos limites, quais dos materiais testados podem ser mais seguros, em termos de compatibilidade indireta com células pulpares, para aplicação sobre dentina profunda.

Levando em consideração a origem dos substratos dentinários usados neste estudo, é importante ressaltar que a substituição da DH por DB em estudos de citotoxicidade indireta *in vitro* requer testes comparativos precisos, os quais devem direcionar a segurança de aplicação clínica de materiais dentários e novos procedimentos^{3,7,112}. Teruel et al.¹⁷ (2015) demonstraram que as semelhanças entre substratos são os principais fatores levados em consideração ao analisar os possíveis substitutos para dentes humanos em estudos laboratoriais. Assim, quanto maior a similaridade entre os substratos, mais valiosos e significativos serão os resultados obtidos para a área do conhecimento⁵⁴. Porém, Laurance-Young et al.¹¹⁴ (2011) relataram que mesmo que os substratos apresentem características morfológicas e composição físico-química semelhantes, os resultados obtidos podem diferir, dependendo do tipo de material testado e do teste empregado.

Alguns pesquisadores já relataram similaridades entre DH e DB quanto aos aspectos morfológicos referentes ao diâmetro e quantidade de túbulos dentinários por área (mm^2)^{15,16}. Todavia, foi demonstrado no presente estudo que o diâmetro dos túbulos dentinários da DB é maior do que da DH (Figura 12 e 13). Esta variação morfológica em comparação aos estudos anteriores pode ser devido às diferenças de metodologia usadas pelos pesquisadores, especialmente com relação a profundidade da dentina e região do dente onde as amostras foram obtidas. Schilke et al.¹⁵ (2000) compararam o número e diâmetro dos túbulos dentinários em incisivos centrais bovinos, molares decíduos humanos e terceiros molares humanos. Para isso, coroas e raízes dos dentes bovinos foram cortadas no sentido mesio-distal e as metades linguais das coroas descartadas. Então, a superfície vestibular da dentina foi polida em baixa velocidade com lixas de carboneto de silício até que a concavidade pulpar fosse completamente apagada. Segundo os autores, esses procedimentos garantiram que o aspecto pulpar representasse uma dentina profunda ou interna. Já no presente estudo, amostras de DB foram obtidas a partir de discos de esmalte e dentina do terço médio da face vestibular dos incisivos bovinos, seguida da remoção do esmalte por meio de uma cortadeira metalográfica¹⁰⁶. Os discos de DH foram obtidos da superfície oclusal de terceiros molares humanos^{6,39}. Além disso, a permeabilidade dos discos de DH e DB foi padronizada no presente estudo, de modo que não houvesse diferença estatística entre os diferentes substratos, bem como entre os grupos, minimizando os possíveis efeitos causados pela diferença no diâmetro dos túbulos dentinários⁶.

Já foi relatado que dentes bovinos apresentam menor quantidade de dentina intertubular e maior quantidade de dentina peritubular em comparação com a DH^{18,115}. Além disso, já foram descritas semelhanças quanto à composição química em relação ao teor de cálcio, fósforo, carbono e nitrogênio (% em peso)^{17,18}. Soares e Santo¹⁸ (2015) encontraram uma espessura aumentada de dentina peritubular na DB quando comparada a DH, o que poderia interferir em protocolos de condicionamento ácido, uma vez que este procedimento causa desmineralização da dentina peritubular e o consequente aumento no diâmetro dos túbulos dentinários^{73,116,117}. Soares e Santo¹⁸ (2015) também mostraram que a DH e DB são quimicamente semelhantes tanto antes quanto após serem tratadas com sistemas adesivos. Dessa forma, os autores concluíram que as possíveis diferenças morfológicas entre estes substratos

permeáveis obtidos de dentes humanos e bovinos parecem não interferir nos resultados obtidos em testes de adesão de materiais dentários à dentina.

Quanto a citotoxicidade dos materiais dentários, sabe-se que os diferentes componentes de produtos resinosos, incluindo monômeros não convertidos em polímeros, podem se difundir através dos túbulos dentinários e atingir a polpa, causando efeitos biológicos adversos nesse tecido^{34,118}. Esta difusão de monômeros livres não reagidos depende de alguns fatores, tais como o tamanho da molécula, sua composição química e grau de hidrofilia, além de fatores diretamente relacionados com o substrato dentário onde os materiais são aplicados, como a permeabilidade e espessura da dentina remanescente^{34,39,74,78,79}. Já foi demonstrado que o diâmetro e a quantidade de túbulos por área (mm²) de dentina aumentam de acordo com a proximidade da polpa^{119,120}. O número de túbulos dentinários presentes na dentina superficial varia entre 10.000 e 25.000/mm², sendo que nesta região eles exibem diâmetro de aproximadamente 1,0 µm. Já na dentina profunda, a quantidade de túbulos varia entre 65.000 e 75.000/mm², com diâmetro de aproximadamente 2,5-3,0 µm^{119,120}. Assim, muito cuidado deve ser tomado quando da realização de procedimentos clínicos sobre dentina profunda de dentes vitais³. Isto porque a grande quantidade e diâmetro dos túbulos no local faz com que este substrato apresente elevada umidade e permeabilidade, fatores estes que interferem negativamente nas propriedades dos materiais resinosos e favorecem a difusão de componentes tóxicos para a polpa^{3,7,34,119,120}.

A histomorfologia do complexo dentina-polpa demonstra que um tipo de célula pulpar especializada, chamada de odontoblasto, se organiza em monocamada para revestir internamente a dentina coronária e radicular¹²¹. Desta maneira, os odontoblastos são as primeiras células da polpa a entrar em contato com componentes dos materiais odontológicos capazes de se difundir pela dentina^{3,5,7}. Como demonstrado em estudos prévios^{11,21,40}, a reprodução desta condição *in vivo* também foi alcançada no presente estudo, onde barreiras (discos) de dentina foram adaptadas em câmaras pulpares artificiais (CPAs). Este modelo de pesquisa permite cultivar células com fenótipo de odontoblasto diretamente na superfície pulpar de discos de dentina, onde elas se aderem e se proliferam para formar uma monocamada celular semelhante àquela observada em dentes vitais de vertebrados^{3,7}.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a viabilidade das células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas na superfície pulpar dos discos de dentina, reduziu significativamente quando o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4), bem como os cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6) e RelyX Ultimate (G9 e G10) foram aplicados na superfície oclusal dos referidos discos, independentemente da origem do substrato (Figura 20). Corroborando com estes dados, as imagens de microscopia de fluorescência, obtidas por meio do ensaio de Live/Dead (Figura 21), demonstraram que estes mesmos grupos exibiam reduzida quantidade de células vivas (coradas em verde) e elevado número de células mortas (coradas em vermelho). De maneira geral, também foi observado, por meio do teste de adesão e espalhamento celular, que uma menor quantidade de células MDPC-23 permaneceu nos compartimentos após a aplicação dos extratos obtidos nos grupos G3, G4, G5, G6, G9 e G10 (Figura 22). Estes interessantes dados científicos permitem especular que as respostas das células pulpares usadas na presente pesquisa tenham sido causadas pelos componentes químicos dos materiais resinosos testados (Tabela 1), os quais podem ter se difundido pela dentina logo após terem sido aplicados, tal como recomendado pelo fabricante, sobre esse substrato permeável. Estudos anteriores demonstraram que muitos monômeros resinosos, tais como metacrilato de 2-hidroxietil (HEMA), metacrilato de bisfenol A-glicidil (Bis-GMA), dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) e dimetacrilato de uretano (UDMA), são tóxicos para as células do tecido pulpar e da mucosa oral^{6,37,39,83}.

Além disso, a difusão desses monômeros via túbulos dentinários pode ser favorecida quando a dentina é condicionada com ácido antes da aplicação do material resinoso^{3,7,121}. O condicionamento ácido da dentina remove a smear layer e smear plugs presentes na dentina mecanicamente cortada/desgastada, bem como desmineraliza a dentina peritubular^{73,116,117,121}. Em dentes vitais, esses efeitos do condicionamento ácido da dentina resultam no imediato aumento da exsudação de fluído dentinário, o qual interfere na conversão de monômeros em polímeros^{3,121}. Num segundo momento, o aquecimento gerado pela fotoativação do material resinoso inverte o fluxo do fluído dentinário, o qual passa a se movimentar para o interior da polpa, carregando com ele os monômeros livres tóxicos não convertidos¹²². Ao alcançar as células pulpares *in vitro*, estes componentes liberados dos materiais

resinosos causam lesões celulares irreversíveis^{5,39,73,121}, sendo que *in vivo*, também podem induzir inflamação crônica tecidual^{38,123-125}.

Num estudo clínico/histopatológico realizado em dentes humanos, o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) Vitremer (3M) aplicado sobre dentina profunda pré-tratada com um primer resinoso ácido, causou intensos danos para a polpa¹²⁵. Porém, outros CIVMRs foram considerados biocompatíveis, mesmo quando aplicados sobre dentina profunda, cujo remanescente de dentina entre o assoalho da cavidade e o tecido pulpar era inferior a 0,4 mm^{7,123,125}. Estes resultados, inicialmente considerados contraditórios, foram explicados pela acidez e alta concentração de HEMA presente no primer aplicado sobre a dentina antes do uso do CIVMR Vitremer.

Sabe-se que o HEMA, dentre os monômeros comumente incorporados aos materiais resinosos usados na prática clínica, é uma molécula hidrófila de baixo peso molecular, a qual apresenta elevado potencial de difusão pelos túbulos dentinários^{39,81,86}. Dependendo da concentração de monômeros que consegue atingir a polpa, estas moléculas tóxicas liberadas dos materiais resinosos podem causar lesão celular direta, seguido de reação inflamatória crônica mediada por macrófagos e células gigantes. Estas células do sistema imunológico fagocitam os corpos estranhos presentes no tecido, porém não conseguem digerir-los, o que faz com que a inflamação pulpar seja persistente^{3,6,7}.

No presente estudo, apesar do CIVMR RelyX Luting 2 (grupos G5 e G6) ter sido aplicado sobre dentina não previamente tratada com primer resinoso ácido, o cimento causou significativos danos para as células MDPC-23 cultivadas na superfície pulpar dos referidos discos (Figura 20) e nas placas de 96 compartimentos (Figura 21). O CIVMR RelyX Luting 2 contém HEMA na sua composição, o que permite sugerir que os efeitos tóxicos observados nas células pulpares após a aplicação desse material possam ter relação com a difusão transdentinária desse monômero tóxico^{39,81,86}. Considerando que os CIVMRs podem levar até 24 horas para concluir sua polimerização, monômeros livres podem se difundir facilmente neste intervalo de tempo, via túbulos dentinários^{39,81,86,124}. Todavia, a presença deste componente químico no RelyX Luting 2 parece explicar, apenas parcialmente, o intenso efeito tóxico causado por este material ionomérico sobre as células MDPC-23. Dessa forma, é possível propor também, que o pH ácido do extrato, obtido após 24 horas de contato

do corpo de prova do RelyX Luting 2 com o meio de cultura (pH=5,47; Figura 14), tenha potencializado os danos celulares observados no presente estudo. Hirose et al.¹²⁶ (2016) relataram que uma solução com pH menor que 6,5 reduz o número de células viáveis ao longo do tempo, sendo que uma solução com pH inferior a 5,5 causa morte celular em 24 horas. Já foi descrito que o baixo pH no espaço extracelular pode induzir a acidificação intracelular^{127,128}, resultando em queda do metabolismo ou mesmo lesão celular irreversível^{129,130}, tal como observado na presente pesquisa.

O cimento resinoso RelyX Ultimate é indicado para aplicação sobre tecido dentário previamente hibridizado por meio de condicionamento ácido e aplicação de um agente adesivo. Provavelmente, a citotoxicidade transdentinária ocorrida nos grupos G9 e G10, onde este cimento foi usado, pode ter sido influenciada pelo protocolo de hibridização do substrato dentinário, tal como observado nos grupos G2 e G3, nos quais o sistema adesivo Single Bond Universal foi aplicado isoladamente³⁹. Tal como relatado anteriormente, o condicionamento ácido da dentina remove a smear layer que recobre a superfície deste substrato, bem como os smear plugs que se localizam na embocadura dos túbulos^{3,121}. Este procedimento aumenta a permeabilidade da dentina, favorecendo a difusão transdentinária de monômeros liberados de materiais resinosos^{3,36,102,131}. Os grupos onde foi usado o cimento resinoso autoadesivo RelyX U200 (G7 e G8) não apresentaram diferença estatística em relação a viabilidade celular quando comparados aos seus respectivos grupos controles negativos (G1 e G2; Figura 20). Este resultado positivo observado para o cimento RelyX U200 pode ter ocorrido como consequência da própria composição química do material e/ou de seu protocolo de aplicação, o qual não requer prévia hibridização da dentina.

É importante ressaltar que o cimento autoadesivo RelyX U200, tal como o cimento adesivo RelyX Ultimate, contém TEGDMA na composição, o qual apresenta definido potencial tóxico sobre células pulpares^{39,82,83}. Porém, sabe-se que além da hidrofiliabilidade, o peso molecular do monômero, o qual reflete seu tamanho, também é um fator que influencia decisivamente a difusão transdentinária destes compostos liberados dos materiais resinosos^{39,87}. Apesar de ter efeito citotóxico superior ao HEMA, o monômero TEGDMA apresenta menor hidrofiliabilidade e maior peso molecular^{86,87,144}. Desta forma, é possível inferir que a aplicação do RelyX U200 (G7 e G8) sobre a dentina não condicionada com ácido e/ou hibridizada com agente

adesivo, não favoreceu a difusão transdentinária de monômeros tóxicos até o espaço pulpar. De Souza Costa et al.³⁸ (2006) demonstraram que um outro cimento autoadesivo (RelyX Unicem, 3M/ESPE), aplicado em cavidades profundas preparadas em dentes humanos, não causou danos ao tecido pulpar. A análise microscópica dos dentes não mostrou evidências de difusão de componentes do material resinoso através dos túbulos dentinários. Da mesma forma, Bezzon et al.³⁴ (2015) relataram que tanto o cimento autoadesivo RelyX Unicem quanto o cimento autocondicionante Multilink (Ivoclar Vivadent), os quais não requerem prévio condicionamento ácido e hibridização da dentina, não causaram reações pulpares adversas quando aplicados em cavidades profundas preparadas em dentes de cães. Assim, a prévia hibridização da dentina exerce forte influência no dano celular transdentinário causado por componentes tóxicos lixiviados de materiais resinosos. Isto explicaria a citocompatibilidade observada no presente estudo para os grupos G7 e G8, a qual contrasta com a notável toxicidade do cimento RelyX Ultimate (G9 e G10) sobre as células MDPC-23 cultivadas na superfície pulpar dos discos de dentina, bem como sobre esta mesma linhagem celular e as HDPCs semeadas em placas de 96 compartimentos.

No presente estudo, redução na atividade da enzima ALP e na formação de NM ocorreu nos grupos onde o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4), bem como os cimentos RelyX Luting 2 (G5 e G6) e RelyX Ultimate (G9 e G10) foram usados (Figuras 23 e 24). Esses resultados são relevantes, pois sabe-se que as características fenotípicas das células MDPC-23, assim como dos odontoblastos, estão relacionadas com a deposição e mineralização da matriz dentinária, a qual foi avaliada nesta pesquisa através da mensuração da atividade da enzima ALP e formação de NM⁶. Desde que uma das principais funções dos odontoblastos é depositar e mineralizar matriz dentinária, esta célula pulpar especializada é responsável por manter o funcionamento harmônico do complexo dentina-polpa, bem como estimular e acelerar o processo de regeneração pulpar em caso de danos a este tecido conjuntivo especializado³. Portanto, qualquer procedimento clínico que interfira nessa atividade odontoblástica, pode causar severas alterações na homeostase do tecido pulpar ou até mesmo a perda de sua vitalidade^{3,6,132}. Diferente do que foi observado nos grupos G3, G4, G5, G6, G9 e G10, a aplicação do cimento resinoso RelyX U200 (G7 e G8) sobre a superfície oclusal dos discos de dentina não reduziu

significativamente a síntese de ALP e deposição de NM em comparação aos seus respectivos grupos controles negativos (G1 e G2). Consequentemente, além de não ter interferido no metabolismo das células MDPC-23, os extratos obtidos do cimento RelyX U200 também não causaram alterações no fenótipo destas células odontoblastóides em cultura, as quais tem sido amplamente usadas para avaliar diferentes classes de materiais dentários e novas terapias empregadas na Odontologia^{6,7}.

Na presente investigação, a atividade de ALP e deposição de NM também foram avaliadas após exposição das HDPCs aos extratos obtidos dos materiais em teste. Considerando que as HDPCs caracterizam um pool de células obtidas da polpa dentária, é de se esperar que uma certa quantidade de células mesenquimais indiferenciadas (MSCs) estejam presentes naquela cultura primária estabelecida^{3,7}. Consequentemente, materiais dentários e/ou alguns de seus componentes presentes nos extratos, podem causar danos às HDPCs ou então estimular a diferenciação das MSCs em células com fenótipo odontoblástico, as quais, por sua vez, passam a sintetizar, depositar e mineralizar matriz dentinária^{117,133,134}. Neste estudo *in vitro*, a presença de uma sub-população de células tronco na cultura primária estabelecida (HDPCs) foi demonstrada por meio do ensaio de imunofluorescência, no qual foram utilizados os marcadores STRO-1 e CD-146¹¹³. De maneira geral, os resultados mostraram que a aplicação dos extratos de todos os materiais resinosos testados causou significativa redução na atividade da enzima ALP em 14 dias (Figura 29). Por outro lado, nos grupos G3, G4, G7, G8, G9 e G10, a deposição de NM foi estatisticamente semelhante ao observado em seus respectivos controles no período de 21 dias (G1 e G2; Figura 30). Assim, pode-se sugerir que aos 14 dias, as HDPCs expostas aos extratos dos materiais sofreram alterações no seu perfil de expressão da enzima ALP em relação aos grupos controle^{66,135}. Porém, nos grupos G3, G4, G7, G8, G9 e G10, essas células foram capazes de superar o dano biológico inicialmente causado pelos extratos, de tal maneira que no período de 21 dias elas conseguiram se proliferar e diferenciar em células com potencial de depositar matriz mineralizada^{66,135}.

Diversos estudos anteriores mostraram que compostos liberados dos materiais resinosos, como os monômeros TEGDMA e HEMA, podem paralisar o ciclo de diferentes tipos celulares, bem como causar depleção do sistema intracelular de

glutathiona e gerar espécies reativas derivadas do oxigênio – EROs^{6,37,57,83,118,136-138}. A glutathiona, agente antioxidante intracelular que protege as células contra os efeitos tóxicos gerados pelos EROs, também desempenha um papel importante na desintoxicação celular. Assim, a depleção da glutathiona causada pela ação de monômeros lixiviados dos materiais resinosos sobre as células pulpares, pode resultar em intensa morte celular por apoptose^{134,136,139}.

Na presente pesquisa, não foi avaliada a formação de EROs nas células pulpares cultivadas sobre os discos de dentina ou naquelas células posteriormente expostas aos extratos dos materiais resinosos. Também, outra limitação do presente estudo foi a não determinação da presença e concentração de monômeros nos extratos. Estes dados seriam relevantes para confirmar as possíveis causas da expressiva morte celular observada nos grupos G3, G4, G9 e G10. Porém, diante dos dados disponíveis, é plausível especular que nesses quatro grupos, onde a dentina foi hibridizada, elevadas concentrações de HEMA e/ou TEGDMA tenham se difundido pelos túbulos dentinários e alcançado o espaço pulpar das CPAs para causar morte das células por necrose. Por outro lado, concentrações mais baixas desses monômeros podem ter interferido no metabolismo celular e/ou induzido a depleção de glutathiona, o que resulta em peroxidação lipídica de membranas e a possível morte das células por apoptose. Independente do tipo de morte celular, a intensa lesão irreversível ocorrida nas células MDPC-23 cultivadas sobre os discos de dentina, resultou no deslocamento delas do substrato, tal como demonstrado nas imagens obtidas em MEV, especialmente nas Figuras 16 e 17.

Na presente investigação *in vitro*, duas linhagens celulares foram selecionadas para avaliar os possíveis efeitos tóxicos dos cimentos resinosos. De acordo com os resultados obtidos, foi possível determinar que estas células responderam de maneira distinta quando os materiais foram aplicados sobre a superfície oclusal de discos de dentina, independente da origem do substrato (DH ou DB). As células MDPC-23 cultivadas em placas de 96 compartimentos foram mais sensíveis aos efeitos adversos dos extratos dos materiais testados do que as HDPCs, o que corrobora com resultados de pesquisas desenvolvidas previamente por Pontes et al.¹³⁹ (2014) e da Fonseca Roberti Garcia et al.³⁹ (2016). Estes autores avaliaram a toxicidade dos cimentos resinosos RelyX ARC, RelyX Luting 2 e RelyX U200 (3M ESPE) aplicados sobre as mesmas linhagens de células usadas na presente pesquisa. Além disso,

Yasuda et al.¹⁴¹ (2008) testaram a citotoxicidade de adesivos dentinários sobre uma cultura primária de células da polpa dental humana (HDPCs) e células odontoblastóides MDPC-23. As HDPCs foram de 5 a 24% mais resistentes aos efeitos tóxicos dos adesivos dentinários do que as células MDPC-23.

Alguns pesquisadores relataram que diferentes linhagens celulares podem apresentar variações de viabilidade quando expostas aos mesmos agentes^{82,142-144}. Ulker et al.⁸² (2012) usaram culturas primárias de células obtidas da polpa de dentes humanos e bovinos para avaliar a citotoxicidade de cimentos resinosos e a geração intracelular de EROs. Os efeitos tóxicos foram diferentes entre os tipos celulares, sendo que as células bovinas (tBPDC) foram mais suscetíveis aos efeitos adversos dos extratos do que as células humanas (tHPDC). Com base nesses resultados, os autores sugeriram que os mecanismos de desintoxicação intracelular eram diferentes entre as células, uma vez que algumas linhagens podem ter maior conteúdo de glutatona do que outras^{145,146}. Além disso, Susila et al.¹⁴³ (2016) relataram que a diferença no percentual de viabilidade entre células pode estar relacionada com a origem e diferenças fenotípicas. Os autores demonstraram que a viabilidade a curto prazo (período de 24 horas) de fibroblastos BHK21 foi inferior àquela observada para células com fenótipo de osteoblastos (MG63). Assim, a resistência aos efeitos tóxicos de alguns materiais resinosos parece ter sido mais baixa na linhagem BHK21 do que nas MG63 em curto prazo. Esses dados científicos obtidos por Susila et al.¹⁴³ (2016) corroboram com os resultados previamente apresentados por Reichl et al.¹⁴⁷ (2001), os quais avaliaram o efeito do TEGDMA e HEMA sobre a liberação de lactatodesidrogenase (LDH) de linhagens de células epiteliais de pulmão alveolar *in vitro*. Para isso, a LDH das células A549 (humana) e L2 (rato) foi avaliada após terem sido expostas por 8 horas a variadas concentrações de ambos os monômeros. De maneira geral, as células L2 foram de 3 a 15 vezes mais sensíveis à liberação de LDH em comparação às A549.

Considerando os resultados destes estudos que avaliaram e compararam a sensibilidade de diferentes linhagens de células expostas a componentes de materiais dentários resinosos, é possível concluir que a resposta celular a estímulos tóxicos está relacionada com as características intrínsecas de cada linhagem. Na presente investigação, bem como em algumas pesquisas anteriores^{39,139} foi possível demonstrar que as células odontoblastóides imortalizadas da linhagem MDPC-23, as

quais foram obtidas da papila dentária de ratos, são mais sensíveis do que a cultura primária de HDPCs estabelecida a partir da polpa de dentes permanentes humanos. Porém, futuros estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos na diferença de sensibilidade destas linhagens celulares expostas aos mesmos estímulos tóxicos.

A variação de viabilidade das HDPCs (Figura 26), observada entre os grupos tratados com o CIVMR RelyX Luting 2 (G5 e G6) e o sistema adesivo Single Bond Universal (G3 e G4), pode ser explicada pela composição destes materiais, como demonstrado na Tabela 1. O adesivo Single Bond Universal apresenta de 15% a 25% do monômero HEMA (em peso) em sua composição. Por outro lado, o conteúdo deste monômero nas pastas A e B do cimento RelyX Luting 2 é de 10% e 10%-30%, respectivamente. Outro fator atribuído ao resultado de maior citotoxicidade deste cimento (G5 e G6) sobre as HDPCs (Figuras 26 e 27), assim como anteriormente apresentado e discutido para as células MDPC-23, é seu pH ácido (Figura 14). O extrato obtido do cimento RelyX Luting 2 apresentou pH=6,27 imediatamente após contato do material com o meio de cultura. Os valores de pH dos extratos obtidos após 1 e 24 horas reduziram para 5,89 e 5,47, respectivamente. Porém, nestes mesmos períodos de avaliação (imediato, 1 e 24 horas), o agente adesivo Single Bond Universal apresentou pH=8,09; 7,85 e 8,40 respectivamente, os quais foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle negativo (Figura 14). Considerando este tópico discutido anteriormente para as células MDPC-23, é possível propor que as HDPCs, bem como outras células de origem pulpar expostas a uma solução ácida, como observado para o cimento RelyX Luting 2 em todos os períodos de análise, tenham sido letalmente agredidas. Hirose et al.¹²⁶ (2016), relataram a parada da proliferação ou mesmo a morte de células pulpares expostas a um microambiente com pH inferior a 6,5; por outro lado, células cultivadas em microambiente com pH entre 7,9 e 9,5 apresentaram maiores taxas de proliferação.

Com relação a viabilidade das células HDPCs, estudos anteriores^{72,148,149} demonstram que o sistema adesivo Single Bond Universal, o qual é conhecido em alguns países como Scotchbond Universal, foi menos citotóxico para alguns tipos celulares, como fibroblastos 3T3⁷², células VERO¹⁴⁹ e células da polpa dental humana (tHPCs)¹⁴⁸. Pupo et al.⁷² (2017) relatam que os sistemas adesivos Ambar (FGM), Adper Scotchbond Multi-Purpose (3M/ESPE), Optibond All-In-One (Kerr) e Adper

Single Bond 2 (3M/ESPE) reduziram em cerca de 47%, 43%, 37% e 26%, respectivamente, a viabilidade de fibroblastos 3T3. Entretanto, o sistema adesivo Scotchbond Universal (3M/ESPE) reduziu em apenas 3% a viabilidade destas mesmas células em cultura. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que este último produto contém o monômero funcional 10-metacriloiloxidecil di-hidrogenofosfato (10-MDP) e uma concentração bastante baixa de HEMA. O 10-MDP é um monômero de longa cadeia de carbono que contribui com a hidrofobicidade e estabilidade hidrolítica dos materiais resinosos¹⁵⁰. Por outro lado, Catunda et al.¹⁴⁹ (2017) demonstram que os adesivos Adper Single Bond (3M/ESPE), Silorane System Adhesive Bond (3M ESPE) e Single Bond Universal (3M/ESPE) não foram citotóxicos para células VERO. Os autores relataram que embora os componentes monoméricos dos sistemas adesivos possam ser tóxicos após liberação inicial, eles parecem não interferir com a proliferação das células VERO. Ainda que nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada entre os sistemas adesivos, Catunda et al.¹⁴⁹ (2017) observaram ligeira diminuição na viabilidade das células VERO no período de 72 horas, corroborando com os dados do presente estudo, onde G1 e G2 (controles) e G3 e G4 (Single Bond Universal) diferiram estatisticamente apenas no período de 72 horas. Catunda et al.¹⁴⁹ (2017) atribuíram esses resultados ao fato de que apenas 50-75% dos monômeros são efetivamente polimerizados em condições ideais, sendo que o restante permanece como monômeros livres. Estes componentes lixiviados dos materiais resinosos têm potencial para se difundir pela dentina e causar efeitos tóxicos nas células, cuja intensidade depende da concentração e tempo de contato¹⁵¹.

No presente estudo, não foi observada diferença estatística de citotoxicidade transdentinária quando um mesmo material foi aplicado sobre discos obtidos de DH e DB com espessura de 400 µm. Este resultado determina a similaridade entre os substratos e conseqüentemente a relevância dos dados obtidos com este tipo de teste laboratorial desafiador. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que a citotoxicidade, bem como a expressão fenotípica das células foi influenciada pelo tipo de material, sua composição e técnica de aplicação^{39,86,87,144}.

Apesar dos resultados da presente pesquisa *in vitro* indicarem que a DB pode ser uma interessante e segura opção para substituir a DH em testes de citotoxicidade transdentinária de materiais resinosos, os dados obtidos devem ser cuidadosamente interpretados. Isso porque *in vivo*, dentes vitais apresentam prolongamentos

citoplasmáticos dos odontoblastos, colágeno e outras proteínas no interior dos túbulos dentinários¹²¹. Assim, além destas estruturas, a pressão de exsudação do fluído dentinário rico em proteínas de baixo peso molecular também pode dificultar a difusão transdentinária de componentes tóxicos liberados pelos materiais dentários, o que pode impedir, ou pelo menos reduzir, os danos às células pulpares subjacentes^{39,73,75}. Dentro deste contexto, apesar de não se recomendar que dados obtidos de pesquisas *in vitro* sejam extrapoladas diretamente para situações *in vivo*^{3,7}, os interessantes resultados alcançados na presente pesquisa podem direcionar protocolos clínicos mais seguro para cimentação de peças protéticas. Estes resultados também indicam a possibilidade de se usar discos de DB para substituir DH, o que incrementa as pesquisas de citotoxicidade transdentinária de materiais dentários, tornando os dados científicos laboratoriais mais relevantes para a área do conhecimento.

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 de-mineralization 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, Haider-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, Baltriukiene 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.

ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA

Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP.



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO DENTINÁRIO HUMANO E BOVINO NA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS UTILIZADOS PARA CIMENTAÇÃO DE RESTAURAÇÕES INDIRETAS

Pesquisador: Carlos Alberto de Souza Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14845019.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.516.632

Apresentação do Projeto:

O objetivo principal desse projeto consiste em analisar a influência dos substratos dentinários humano e bovino na citotoxicidade transdentinária de materiais utilizados para cimentação de restaurações indiretas sobre células pulpares e comparar o possível efeito citotóxico transdentinário destes materiais. Para isso, inicialmente, será realizada a confecção das câmaras pulpares artificiais (CPAs) utilizando discos de dentina de origem humana (n=60) e bovina (n=60), apresentando 0,4 mm de espessura, a fim de mimetizar a realização de um preparo cavitário cuja espessura do remanescente dentinário encontra-se muito próxima ao tecido pulpar. A seguir, as CPAs serão adaptadas em placas de 24 compartimentos contendo meio de cultura e os materiais utilizados para cimentação de restaurações indiretas serão aplicados sobre a superfície oclusal dos discos. Após 24 h de incubação, o meio de cultura contendo os componentes liberados dos materiais dentários que se difundirem através do disco de dentina (extrato) será aplicado sobre células odontoblastóides MDPC-23 e sobre células pulpares (obtidas a partir de terceiros molares humanos hígidos; n=4), a fim de avaliar a influência desses materiais na viabilidade, morfologia, adesão e espalhamento celular, bem como sobre a expressão fenotípica destas células. Para a condução do estudo, serão testados um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, um cimento resinoso convencional e um cimento resinoso autocondicionante. Como controle positivo,

Endereço: HUMAITÁ 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 3.5/6.632

O projeto trará contribuição para a área ao qual se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 16 de Agosto de 2019.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1360948.pdf	16/07/2019 16:19:07		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	16/07/2019 16:15:41	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_CEP_modificado.pdf	16/07/2019 16:12:49	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.pdf	16/07/2019 15:57:24	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Outros	Declaracao_financiamento_proprio.pdf	31/05/2019 13:44:49	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Cumprimentos_Normas.pdf	31/05/2019 13:43:11	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizaca_cirurgia.pdf	31/05/2019 13:42:46	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizaca_LPEB.pdf	31/05/2019 13:42:17	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	31/05/2019 13:18:51	Carlos Alberto de Souza Costa	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho até dia 8 de julho de 2023

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 08 de julho de 2021.

Isabela dos Reis Souza