



FACULDADE DE MEDICINA
Universidade de Coimbra

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS INDICADOS EM PROTEÇÕES
PULPARES DIRETAS**

Estudo *in vitro*

Orientadora: Professora Doutora Eunice Carrilho

Co-orientadora: Mestre Anabela Paula

Carla Adriana Rebelo Fernandes

Coimbra 2014

CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS INDICADOS EM PROTEÇÕES PULPARES DIRETAS

Estudo *in vitro*

Fernandes C*, Carrilho E**, Paula A***

* Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

** Professora auxiliar com agregação do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

*** Assistente convidada do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas
3000 – 075 Coimbra
Telefone: +351 239484183
Fax: +351 239402910
Coimbra, Portugal

Endereço eletrónico: adriana_14_360@hotmail.com

RESUMO

Introdução: A avaliação dos materiais dentários tem vindo a demonstrar particular interesse dado, determinados componentes, poderem provocar efeitos citotóxicos em contacto com o complexo dentino-pulpar, aquando dos procedimentos de proteções pulpares. Historicamente vários materiais foram utilizados nesse sentido, incluindo o hidróxido de cálcio, sendo actualmente considerados como “*gold standard*” os cimentos trióxidos minerais, como o MTA. A introdução de novos materiais semelhantes e com as mesmas indicações clínicas, como o novo cimento à base de silicato de cálcio (Biodentine™), exige a necessidade de testar as suas características citotóxicas, até ao momento parcamente investigadas.

Objetivo: o objetivo deste estudo experimental é a avaliação da citotoxicidade dos materiais utilizados em proteções pulpares diretas (Life®, White ProRoot® MTA e Biodentine™) *in vitro*. Com isto, pretende-se efetuar o estudo comparativo dos materiais através de diferentes parâmetros de avaliação da citotoxicidade.

Materiais e métodos: a linha celular de fibroblastos humanos (HFF1) foi incubada com diferentes concentrações de Life®, White ProRoot® MTA e Biodentine™, utilizando a metodologia dos meios condicionados segundo a norma ISO 10993-5, durante 24, 72 e 120 horas. A avaliação da atividade metabólica foi realizada através do ensaio do MTT, a avaliação do conteúdo proteico foi realizada através do ensaio da sulforrodamina B e a avaliação dos tipos de morte celular foi realizada através do ensaio da citometria de fluxo.

Resultados: A citotoxicidade do Life® e Biodentine™ diminui com o aumento das diluições, no entanto, ao longo do tempo a citotoxicidade do Life® tendencialmente aumenta e a do Biodentine™ diminui. Estes resultados apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. O White ProRoot® MTA mantém um padrão de biocompatibilidade semelhante em todas as diluições, que tendencialmente aumenta com o tempo. O Life® mostrou ser o material mais citotóxico, seguindo-se o Biodentine™ e finalmente o White ProRoot® MTA.

Conclusão: A atividade metabólica e viabilidade celular dos materiais relaciona-se com as diluições efetuadas e/ou com o tempo de exposição aos meios condicionados. Tal como esperado, o Life® devido aos seus padrões de citotoxicidade elevados, não é recomendável para utilização em proteções pulpares diretas. O White ProRoot® MTA, devido às sua biocompatibilidade e propriedades que apresenta, demonstra ser um material eficaz e recomendável para esse fim. Quanto ao Biodentine™, apesar de serem previstos níveis de toxicidade semelhantes ao White ProRoot® MTA, isso não se verifica para diluições iniciais. Apesar das suas propriedades físicas, tempo de presa e manipulação favoráveis, novos estudos de citotoxicidade devem ser efetuados de modo a utilizá-lo seguramente como uma alternativa viável ao White ProRoot® MTA.

Palavras-chave: citotoxicidade; fibroblastos; protecção pulpar direta; White ProRoot[®] MTA; Life[®]; Biodentine[™].

ABSTRACT

Introduction: The evaluation of dental materials has shown particular interest because certain components may cause cytotoxic effects in contact with the pulp-dentin complex, when the pulp capping procedure occurs. Historically, various materials were used in this purpose, including calcium hydroxide, however, the trioxides mineral cements (like MTA) are currently considered the gold standard. With the introduction of new materials with equal clinical indications as the new cement based on calcium silicate (Biodentine™), becomes indispensable to test their cytotoxic patterns, even more so, with the lack of studies regarding this topic.

Objective: The aim of this experimental study is to evaluate the cytotoxicity *in vitro* of direct pulp capping materials (Life®, White ProRoot® MTA and Biodentine™). With this, we intend to carry out a comparative study of material through different cytotoxicity valuation parameters.

Materials and methods: The fibroblast cell line (HFF1) was incubated with different concentrations of Life®, White ProRoot® MTA and Biodentine™, using extracting techniques according to the ISO 10993-5 standard, during 24, 72 and 120 hours. The assessment of metabolic activity was performed using the MTT assay, the protein content appraisal was performed using the sulforhodamine B assay and the assessment of the cell's death types was performed with flow cytometry assay.

Results: The Biodentine™ and Life® cytotoxicity decreases with the increase in dilution, however, over time the cytotoxicity of Life® tends to increase while in Biodentine™ it decreases. These results demonstrate statistically significant differences when compared to the control sample. The White ProRoot® MTA retains a similar biocompatibility pattern across all the dilutions, which tends to increase over time. Life® revealed as the most cytotoxic, followed by Biodentine™ and White ProRoot® MTA.

Conclusion: The metabolic activity and cell viability of the materials relates with the dilutions realized and/or with the time exposed to conditioned media. As expected, due to the high cytotoxicity levels, Life® is not recommended for the use in direct pulp capping. White ProRoot® MTA, taking in account its biocompatibility and proprieties demonstrated, is safe to say that it is a type of material adequate to the propose treatment. Referring to Biodentine™, despite being expected toxicity levels similar to White ProRoot® MTA, this does not happen for initial dilutions. Although its physical proprieties, setting time and favorable handling, new cytotoxicity studies should be performed in order to use it safely as a viable alternative to White ProRoot® MTA.

Key words: cytotoxicity; direct pulp capping; fibroblasts; White ProRoot® MTA; Life®; Biodentine™

INTRODUÇÃO

A dentina é um tecido mineralizado, avascular e com características únicas na relação com o tecido pulpar. Ambos têm origem a partir da mesma estrutura embriológica e mantêm uma relação funcional ⁽¹⁾. Por serem considerados indissociáveis, a dentina e o tecido pulpar são mais frequente e apropriadamente abordados como uma estrutura única e integrada, denominada de complexo dentino-pulpar. Deste modo, os traumas infligidos à dentina repercutem-se no tecido pulpar, levando a que as células da polpa respondam a situações clínicas que causam lesões ou perda da integridade dos tecidos duros do dente ⁽²⁾. Na verdade, qualquer estímulo (reação inflamatória ou modificações de natureza degenerativa) que seja captado pelas células pulpares desencadeia uma resposta que levará à formação e deposição de dentina. Consequentemente, ocorrerá diminuição da dimensão da câmara pulpar ou dos canais radiculares como forma de proteção e manutenção da vitalidade pulpar. O tecido pulpar é, então, responsável direto pelas alterações fisiológicas resultantes no órgão dentinário ⁽³⁾.

Deste modo, a investigação em torno desta área, tem vindo a permitir consideráveis melhorias dos materiais e equipamentos ao dispor, tendo sempre em vista o sucesso do tratamento, com menores dificuldades e riscos.

1) Características gerais do substrato dentinário

A dentina é um tecido mineralizado e avascular que delimita a cavidade pulpar, estabelecendo com esta, ligações através dos túbulos dentinários ⁽⁴⁾. A sua composição é descrita como sendo, em peso, 70% de componentes inorgânicos (principalmente cristais de apatite), 20% de componentes orgânicos (principalmente colagénio tipo I) e 10% de água, representada pela composição do fluído no interior dos túbulos dentinários.

Algumas proteínas não colagénicas exercem também uma função biológica importante na resposta do complexo dentino-pulpar a agentes agressores, como é o caso de duas proteínas específicas da dentina, nomeadamente a fosfoproteína (DPP) e a sialoproteína da dentina (DSP). A elevada capacidade de ligação aos iões cálcio das fosfoproteínas envolvem-nas no processo de mineralização ⁽⁵⁾.

Outras proteínas a destacar são também as proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) e os fatores de crescimento (TGF- β s) ^(6, 7). A dentina possui uma estrutura tubular em toda a sua extensão (da pré-dentina até à junção amelo-dentinária) constituindo a sua principal característica ⁽⁸⁾.

Os túbulos dentinários seguem um trajecto sigmóide ⁽⁴⁾. No interior dos túbulos estão abrangidos os prolongamentos odontoblásticos que estão diretamente relacionados com mecanismos fisiológicos envolvidos na defesa do complexo dentino-pulpar. Além dos prolongamentos celulares, os túbulos também contêm fluído, com origem no fluído tissular presente no tecido pulpar, constituído por proteínas como albumina, imunoglobulina e

fibrinogénio^(9, 10). No interior dos túbulos são também encontradas fibras nervosas e fibrilas de colagénio não mineralizadas, que estão presentes em cerca de 65% dos túbulos próximos do tecido pulpar⁽¹¹⁾.

Os túbulos dentinários variam de aproximadamente 2,5 µm a 1 µm ou menos de diâmetro nas suas terminações pulpares ou periféricas⁽⁴⁾. O facto da densidade e orientação dos túbulos dentinários variar em função da localização na dentina⁽¹²⁾ e o diâmetro variar em função da distância em relação à superfície da câmara coronária, constitui um fator decisivo na escolha do material de proteção do complexo dentino-pulpar em relação à sua biocompatibilidade. Desta forma, um mesmo material poderá ser considerado biocompatível se aplicado em cavidades de média profundidade e apresentar efeitos citotóxicos indesejáveis se for aplicado em cavidades profundas ou diretamente sobre o tecido pulpar⁽¹³⁾.

As paredes dos túbulos dentinários na dentina intertubular recentemente formada na superfície pulpar são constituídas essencialmente por colagénio tipo I mineralizado. Com a maturação, outro tipo de dentina é depositado nas paredes dos túbulos (dentina peritubular). A sua deposição ao longo do tempo conduz à obliteração dos túbulos. A dentina peritubular e intertubular distinguem-se pela ausência de matriz fibrosa colagénica da primeira, sendo que a dentina peritubular é cerca de 15% mais mineralizada que a intertubular⁽⁴⁾.

2) Características gerais da polpa

O tecido pulpar é responsável pela formação da dentina. Caracteriza-se por ser um tecido conjuntivo, envolvido em toda a sua extensão por tecido dentinário, exceto na constrição apical do canal radicular, onde se torna contínua com o ligamento periodontal.

Embora o tecido pulpar tenha um contributo significativo durante o desenvolvimento e erupção do dente, este permanece ativo durante toda a vida à medida que a dentina secundária se vai formando e é capaz de responder, dentro de certos limites, a estímulos aplicados sobre ela, como cárie, trauma e procedimentos restauradores que levam à produção de dentina terciária. As células diretamente responsáveis pela deposição de dentina, células odontoblásticas, localizam-se na periferia do tecido. Nesta região existem, também, dois elementos capazes de detetar estímulos externos, bem como iniciar e participar na resposta a eles. São as terminações nervosas aferentes do trigémio e as células especializadas apresentadoras de antígenos⁽⁴⁾.

A composição da polpa é, essencialmente, 75% de peso de água e 25% de material orgânico⁽⁴⁾. Estruturalmente é organizada em zonas denominadas de camada odontoblástica, zona acelular ou de Weil (onde existe o plexo nervoso de Rashow), zona rica em células e porção central da polpa. As células que predominam na porção central são as mesenquimatosas indiferenciadas e os fibroblastos, que juntamente com as fibras colagénicas e algumas fibras elásticas presentes, são sustentadas pela substância fundamental ou matriz extracelular⁽¹⁴⁾.

Células mesenquimatosas são encontradas em grande quantidade na zona rica em células e, em menor quantidade, dispersas na porção central da polpa. Se ocorrer morte dos odontoblastos, essas células são recrutadas a diferenciarem-se em novos odontoblastos⁽⁷⁾.

A mobilização deste tipo de células no mecanismo de reparação pulpar está diretamente relacionado com o grau de comprometimento dos odontoblastos primários. Estas células podem também originar qualquer componente celular do tecido, tal como fibroblastos, células endoteliais, entre outras, dependendo do estímulo recebido. Por isso, são também designadas por stem cells^(4, 7).

3) Mecanismos de defesa do complexo dentino-pulpar

Os mecanismos de defesa do complexo dentino-pulpar a agressões de origem mecânica, química, térmica ou biológica são a inflamação e resposta humoral, a deposição de dentina intratubular e a deposição de dentina terciária. Todos esses eventos vão ter como objetivo principal a manutenção da vitalidade do tecido, nomeadamente dos odontoblastos, que são as primeiras células sensibilizadas pelo agente agressor⁽¹⁵⁾. A formação de dentina terciária, classificação histogenética de dentina produzida perante estímulos ou agressão, constitui um mecanismo de defesa do complexo dentino-pulpar. Se a intensidade da agressão não culminar com a morte celular, a dentina terciária depositada é denominada de dentina reacional⁽¹⁶⁾. Se a intensidade da agressão exceder a capacidade adaptativa e de resposta defensiva dos odontoblastos primários, eles sofrem morte celular e entram num processo de degeneração. Durante o processo de cura do tecido conjuntivo, essas células são repostas por células mesenquimatosas indiferenciadas que são induzidas a sofrer diferenciação em novos odontoblastos⁽¹⁷⁾. As primeiras camadas de matriz dentinária depositadas por essas células constituem um tecido amorfo e atubular denominado de dentina reparadora⁽²⁾.

4) Proteção pulpar direta

A proteção pulpar direta tem como objetivo a preservação do tecido pulpar exposto à cavidade oral, evitando-se, desta forma, a utilização de procedimentos endodônticos mais invasivos⁽¹⁸⁾. O seu mecanismo de ação pode ser descrito como o recobrimento de tecido pulpar exposto, através de substâncias biologicamente inertes, e está indicado em casos de lesão pulpar reversível, sem patologia periapical ou após trauma físico recente ou exposição mecânica, num dente maduro ou em desenvolvimento, preservando a vitalidade pulpar⁽¹⁹⁻²²⁾. A proteção pulpar consiste, então, num mecanismo de reparação e recuperação pulpar através da deposição de tecido mineralizado pelas células do tecido pulpar⁽²³⁾. De um modo geral, este procedimento operatório deve eliminar o estímulo agressor, controlar a hemorragia e promover a assepsia e desinfeção⁽²²⁾. O sucesso desta terapêutica passa também pela escolha adequada do material de execução da proteção pulpar, sendo este capaz de promover uma resposta

reparadora da lesão. Torna-se também necessária uma correta restauração de modo a impedir a microinfiltração marginal de microorganismos a médio/longo prazo ^(15, 24).

O sucesso da proteção pulpar direta é discutido controversamente na literatura. Esta controvérsia é devido ao facto de existirem diferentes causas para uma exposição pulpar e pelo potencial de regeneração pulpar, após a terapêutica, depender de vários fatores como a idade do paciente, localização do dente na arcada, o *status* pulpar, prevenção da contaminação bacteriana durante o ato operatório, tamanho da exposição, controlo da hemorragia, qualidade de selamento do material utilizado, restauração final e tempo de follow-up ^(25, 26).

5) Materiais para proteção pulpar direta

O sucesso de uma proteção pulpar direta está diretamente relacionado com a técnica e o material utilizado ⁽²⁶⁾. A remoção da irritação, o controlo da infeção e a biocompatibilidade do material são fatores criteriosos no sucesso da terapêutica ⁽²²⁾. O potencial dentinogénico do tecido pulpar resulta de um efeito biológico indutivo do material utilizado mas, também, está relacionado com um mecanismo de cicatrização do tecido pulpar afetado ⁽²⁷⁾. Avanços na compreensão da fisiologia pulpar, progressão da lesão de cárie, mediadores inflamatórios e mecanismos de defesa pulpar, têm vindo a mudar a aproximação clínica de remoção de cárie e os protocolos de proteção pulpar direta ⁽²⁶⁾. O tecido pulpar possui um potencial de reparação tecidular que permite, desta forma, a formação de dentina reparadora, como acima já referido.

Historicamente, diferentes materiais têm vindo a ser utilizados em proteções pulpares diretas. Destacam-se os cimentos de ionómero de vidro modificados por resina, fosfatos de tricálcio, resinas hidrofílicas e o hidróxido de cálcio ⁽²⁸⁾. A escolha do material para proteção pulpar direta deve ter em conta a sua capacidade antimicrobiana, a indução de mineralização e a capacidade de selamento, de modo a impedir posteriores microinfiltrações ⁽²⁹⁾. O sucesso do material é avaliado pela sua biocompatibilidade, pela morfologia e espessura da ponte dentinária formada e intensidade da inflamação pulpar ^(28, 30).

5.1) Hidróxido de Cálcio

O hidróxido de cálcio (HC) tem vindo a ser utilizado em diferentes situações clínicas. Depois da sua primeira introdução em Medicina Dentária, em 1920 por Herman, na Alemanha, as suas aplicações clínicas incluem proteções pulpares diretas, medicação intracanal, técnicas de apexificação e apexogénese, perfurações radiculares, fazendo parte também da composição de vários cimentos endodônticos ⁽³¹⁻³³⁾. O HC é um dos materiais dentários mais estudados, e era classicamente utilizado como “*gold standard*” em testes de biocompatibilidade, devido ao seu efeito direto ou indireto na reparação do tecido pulpar exposto ⁽³⁴⁾. O mecanismo de reparação pulpar através do HC ainda não está completamente esclarecido, no entanto, tem sido descrito que o pH alcalino das soluções de HC pode solubilizar e libertar proteínas e fatores de crescimento a partir da dentina. Estes eventos podem ser os responsáveis pela reparação pulpar

e formação de uma barreira de tecidos duros ^(31, 34). Devido ao seu elevado pH, verifica-se a indução de uma camada de necrose de coagulação quando em contacto direto com o tecido pulpar. Os produtos do HC não atuam como bioestimulantes nem são biocompatíveis. Verifica-se que as células em contacto com o HC são mortas devido ao seu pH alcalino, formando, então, uma camada necrótica (zona de cauterização) de espessura variável ^(34, 35). De seguida, o tecido pulpar subjacente vai ser responsável pela reparação do tecido pulpar associada à formação de uma barreira de tecido duro. Num primeiro momento, verifica-se uma calcificação distrófica na margem e, no interior, a deposição de fibras reticulares imediatamente abaixo da zona granular, onde as células odontoblastóides se vão organizar e diferenciar para produzir dentina ⁽³⁴⁾. O pH alcalino do HC neutraliza o ácido lácteo proveniente dos osteoclastos, prevenindo a dissolução de componentes mineralizados do dente. Activa, também, a fosfatase alcalina que tem um papel fundamental na formação de tecidos duros ⁽³¹⁾. Apesar do longo tempo de utilização clínica do HC em diversas terapêuticas pulpares e das taxas de sucesso nos mesmos, vários estudos a longo prazo evidenciam que este não possui as melhores propriedades para ser utilizado nestas terapêuticas. Segundo diversos autores as desvantagens da sua utilização passam pela imprevisibilidade, má adaptação à estrutura dentinária, degradação gradual, não promoção de uma diferenciação odontoblástica consistente e, vários estudos, referem ainda a sua citotoxicidade ^(19, 21, 22, 26, 27, 29, 33, 34, 36, 37, 38). A dentina reparadora formada é também caracterizada pelos defeitos em túnel. Esses defeitos, existentes na ponte dentinária, podem levar à microinfiltração de microorganismos a longo prazo, ativar células imunitárias em circulação, induzir irritação pulpar e levar a calcificação distrófica ⁽²⁶⁾.

5.2) MTA

Apesar da longa utilização de materiais à base de HC para proteção do complexo dentino-pulpar, em grande parte devido ao seu potencial de indução de tecidos duros e consequente formação de uma ponte dentinária surgiram, então, novos materiais que vieram de certa forma, substituir e colmatar algumas das desvantagens associadas ao HC. Um desses materiais é o *Mineral Trioxide Aggregate* (MTA), introduzido em 1993 e desenvolvido por Mahmoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda (Califórnia). O MTA é um material à base de silicato de cálcio, reconhecido pelas suas características de bioatividade, biocompatibilidade e capacidade de condução e indução de tecidos duros ⁽³⁹⁾. Os principais constituintes do pó do MTA são o óxido de cálcio (CaO) e silício (SiO) ⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Estes dois componentes constituem cerca de 70-95% do cimento ⁽¹⁹⁾. Quando estes componentes são misturados, é produzido silicato tricálcico, silicato dicálcico e aluminato tricálcico ⁽⁴⁰⁾. O MTA é conhecido por ser um cimento hidráulico, uma vez que toma presa e é estável em ambiente húmido ⁽⁴¹⁾. Na adição de água, forma-se um gel de silicato hidratado. Vários estudos reportam que a maior parte dos componentes do MTA são, então, o cálcio e sílica, bem como óxido de bismuto. (Citado em ⁽³⁹⁾). Diferentes fases estão presentes na reação de presa do MTA dependendo de eventuais adições

de outros componentes que se possam fazer, modificando as suas propriedades^(41, 42). As vantagens de utilização do MTA como protetor pulpar direto passam pelo seu poder de selamento, pH alcalino, força compressiva, libertação de substâncias, biocompatibilidade e radiopacidade^(3, 19, 21, 24, 26, 29, 39-41, 43). A capacidade de selamento deste material não é afetado pela humidade⁽³⁹⁾ e não é reabsorvível na presença de fluídos⁽²⁶⁾. Possui ainda elevada resistência à penetração de microorganismos^(26, 29, 39). Em relação ao seu pH, este é cerca de 10.2 após mistura^(3, 39) e aumenta para 12.5 após 3 horas^(3, 26, 39). O elevado pH do MTA está associado à constante libertação de cálcio e conseqüente formação de hidróxido de cálcio^(26, 39). O pH do MTA permite a libertação de fatores de crescimento da dentina adjacente, responsáveis pela formação da ponte dentinária^(22, 26), formação essa também associada à sua capacidade de selamento e biocompatibilidade⁽³⁶⁾. A libertação de iões cálcio vai também permitir a formação de uma linha intersuperficial de hidroxiapatite reacional, quando em contacto com os fluídos e contribuir para a formação da ponte dentinária⁽²⁶⁾. O mecanismo de ação do MTA é muitas vezes associado ao do HC^(36, 44). No entanto, no caso do MTA, inicialmente verifica-se uma desnaturação das células adjacentes e proteínas teciduais (essa desnaturação inclui algumas bactérias que podem estar na região exposta). Quando o material toma presa, verifica-se uma mudança no pH, diminuindo a desnaturação celular, ao contrário do que se verifica com o HC, em que as lesões celulares permanecem por longos períodos de tempo⁽³⁵⁾. A atividade antimicrobiana do MTA também está associada ao seu pH. No entanto, esta atividade é limitada a algumas bactérias facultativas e não tem efeito sobre bactérias anaeróbias estritas. Verifica-se, também, que o nível de significância do MTA em promover proliferação celular, diminuição da inflamação pulpar, libertação de citocinas e indução da diferenciação celular, o tornam um material seguro e eficaz de utilização clínica em proteções pulpares diretas⁽¹⁹⁾. As principais desvantagens associadas a este material passam pelo seu potencial de descoloração, presença de elementos tóxicos na sua composição, dificuldade de manuseamento, longo tempo de presa, preço elevado, ausência de um solvente conhecido e dificuldade de remoção após toma de presa^(30, 38), (citado⁽²⁴⁾). Alguns esforços têm sido feitos em melhorar algumas das características do MTA adicionando⁽⁴²⁾ ou removendo diferentes elementos. No entanto, a tentativa de eliminar estas limitações pode afetar as características ideais deste material⁽²⁴⁾. Neste sentido, novos materiais à base de silicato de cálcio têm vindo a ser desenvolvidos, um deles é o Biodentine™.

5.3) Biodentine™

Biodentine™ é um cimento bioativo à base de silicato de cálcio, introduzido recentemente, com propriedades idênticas à dentina, podendo mesmo ser utilizado como substituto dentinário^(45, 46). Tem vindo a demonstrar um efeito positivo em células pulpares vitais e estimula a formação de dentina reparadora^(38, 45, 46). Este material é desprovido de alumínio e sulfato de cálcio, sendo constituído por um pó que contém essencialmente silicato tricálcio (regula a reação de presa), carbonato de cálcio (carga) e dióxido de zircónio (radiopacificador). A

parte líquida contém água, cloreto de cálcio (acelerador) e um polímero hidrossolúvel que é um agente controlador da humidade. A diminuição do conteúdo líquido permite diminuir o tempo de presa. De uma forma geral, as suas principais vantagens em relação ao MTA são o tempo de presa curto (12 minutos), permitindo mesmo uma restauração coronária imediata, bem como melhores propriedades mecânicas ^(46, 47). As propriedades de manipulação do Biodentine™ também são melhores que o MTA, uma vez que, apesar de requerer equipamento extra, a manipulação é feita de forma automatizada durante 30 segundos, ao contrário do MTA em que erros de manipulação e proporção poderão influenciar as propriedades do material ⁽³⁸⁾. De forma a melhorar as propriedades mecânicas deste material, diferentes aspetos estão envolvidos: a tecnologia de biossilicato activo™ permite eliminar alumínio e outras impurezas; o tamanho das partículas é fundamental, de modo a alcançar uma densidade de pó ideal e o carbonato de cálcio foi selecionado devido à sua biocompatibilidade e teor em cálcio. Outro fator importante é o teor em água. O seu excesso pode criar porosidade e diminuir a resistência mecânica, no entanto, a sua diminuição pode criar uma mistura menos homogénea. Com a adição do polímero hidrossolúvel, descrito como “agente redutor de água”, é possível manter o equilíbrio entre o baixo teor de água e a consistência da mistura. Num estudo de Koubi G. et al. em que avaliou o desempenho e segurança do Biodentine™ em restaurações de dentes posteriores, verifica-se que este material pode ser usado com sucesso até aos seis meses, momento a partir do qual se começa a verificar algum grau de abrasão sem, no entanto, nenhuma descoloração marginal ⁽⁴⁸⁾. Atualmente, apesar das suas propriedades físicas e características mecânicas estarem já bem documentadas, ainda existe alguma limitação de informação no que se refere à citotoxicidade deste material.

6) Citotoxicidade

A avaliação das propriedades e constituição dos materiais dentários, tem vindo a demonstrar particular interesse, já que determinados componentes podem, eventualmente, afetar os tecidos circundantes, interferir no processo de cicatrização e/ou causar reações alérgicas. A introdução de novos materiais para utilização em proteções pulpares, como já foi referido, exige a necessidade de testar as suas características e efetuar o seu estudo comparativo com materiais já regularmente utilizados, cujos efeitos já foram testados e são, portanto, conhecidos. ^(2, 23)

Os materiais utilizados nestes procedimentos, dado que são colocados em contacto direto com tecidos vivos e/ou remanescentes celulares odontogénicos, podem provocar efeitos adversos como citotoxicidade, inflamação ou proliferação. Tais condições podem levar à degeneração do tecido adjacente ao material, podendo atrasar ou inviabilizar a cicatrização. Assim, estes materiais deverão ser não tóxicos, não mutagénicos e imunologicamente compatíveis com os tecidos circundantes ^(23, 34, 42).

A citotoxicidade é um fenómeno *in vivo* complexo, podendo levar a um largo espectro de efeitos, desde a morte celular até alterações metabólicas. Alguns estudos podem classificar um material como não-tóxico por não induzir alterações na proliferação celular, actividade mitocondrial ou na síntese de DNA e, no entanto, o mesmo pode alterar algumas vias metabólicas, detetadas por outros ensaios ^(2, 49).

Dentro das várias metodologias recomendadas para estudar a biocompatibilidade e citotoxicidade dos materiais dentários em diferentes níveis de investigação, os testes de cultura celular *in vitro* são parte dos protocolos iniciais mais utilizados. Estudar a citotoxicidade é um passo fundamental, pois permite perceber o mecanismo biológico que produz o efeito citotóxico e o mecanismo de acção de diferentes materiais durante a interação material-tecido. O documento de regulamentação que padroniza os testes de citotoxicidade *in vitro* e selecciona os métodos mais adequados é a ISO 10993-5, estabelecida em 1992 ^(42, 49).

Geralmente, a citocompatibilidade destes materiais é testada com técnicas de cultura celular, que utilizam linhas celulares já estudadas.

Relativamente aos materiais com indicação para utilização em proteções pulpares diretas, vários estudos reportam para o elevado efeito citotóxico do HC em diferentes linhas celulares, verificando-se uma diminuição da proliferação e viabilidade celular ao longo do tempo, comparativamente ao MTA ^(23, 27, 34, 50, 51). Este, por outro lado, apresenta menor efeito citotóxico, fomentando a viabilidade e proliferação celular, em diferentes linhas celulares e ensaios realizados ^(23, 27, 34, 50-52). Relativamente ao Biodentine™, apesar da informação limitada acerca de parâmetros de citotoxicidade atualmente disponível, alguns estudos remetem para uma resposta semelhante ao MTA ^(30, 38, 53). No entanto, para o Biodentine™ efeitos citotóxicos superiores são também relatados, apresentando, contudo, melhores propriedades físicas ⁽⁵⁴⁾.

Deste modo, o objetivo deste estudo experimental, é a avaliação da citotoxicidade *in vitro* do novo cimento de silicato de cálcio (Biodentine™), utilizado em proteções pulpares diretas, bem como de materiais que historicamente foram utilizados nesse sentido (Life®) e que atualmente são considerados “*gold standard*” (White ProRoot® MTA). Assim, pretende-se efetuar o estudo comparativo dos materiais através de diferentes parâmetros de avaliação da citotoxicidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a citotoxicidade de três materiais de utilização em medicina dentária (Life[®], White ProRoot[®] MTA e Biodentine[™]) e efetuar o seu estudo comparativo. Para avaliação do efeito citotóxico, utilizou-se uma linha celular de fibroblastos humanos (HFF1) e procedeu-se à realização de estudos *in vitro* tal como descrito em seguida.

1. Culturas celulares

A linha celular de fibroblastos humana HFF1 (Human Foreskin Fibroblast) foi obtida através da American Type Culture Collection (ATCC[®] SCRC-1041) e cultivada de acordo com as recomendações do fornecedor. Assim, esta linha celular foi mantida a uma temperatura de 37°C numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora HeraCell 150. Foi utilizado o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - D564 - Sigma), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco[®] 2010-09), 100µM de piruvato de sódio (Gibco[®] - 11360) e 1% de antibiótico (100U/ml de penicilina e 10U/ml de estreptomicina; Gibco[®] 15140-122).

2. Preparação do meio de cultura

Para preparação de 500ml de meio de cultura pesou-se 6,70g de DMEM em pó e 1,25g de bicarbonato de sódio, que depois de diluído em água ultrapura, o pH foi regularizado a 7,4 com recurso a soluções concentradas de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl). Na câmara de fluxo laminar, adicionaram-se 1,25ml de piruvato de sódio (25µM), 5ml de antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina) e 50ml de FBS (Soro Bovino Fetal, do inglês Fetal Bovine Serum). Posteriormente filtrou-se a solução e, de modo a permitir a manutenção das células e estimular o crescimento celular foram utilizados frascos de 75cm² de área com 15ml de DMEM suplementado com 10% de FBS.

3. Preparação de placas para experiências

Para a realização de subculturas celulares e preparação de experiências, as células foram desagregadas do substrato, na câmara de fluxo laminar, através da lavagem destas com PBS (Tampão Fosfato Salino, do inglês Phosphate Buffered Saline), sendo posteriormente adicionada tripsina. Após confirmação ao microscópio que as células se encontravam destacadas foi colocado meio de cultura nos frascos, de modo a inibir a tripsina, e suspendeu-se o conteúdo de forma a torná-lo homogéneo.

Foram selecionadas placas com 96 poços, tendo-se efetuado uma prévia contagem de células, de modo a garantir uma quantidade aproximada destas em cada poço. Inicialmente o plaqueamento foi realizado de acordo com o protocolo descrito acima. Após isso, o conteúdo foi colocado num falcon e centrifugado a 1000G durante cinco minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7cm). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e os *pellets* foram

suspensos num volume conhecido de meio de cultura. Procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular corada com azul de tripano, em câmara de *neubauer*, num microscópio com ampliação de 100 vezes. Após a contagem das células e o cálculo da sua média podemos calcular a concentração celular que temos no tubo de falcon. Aplicando a fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração pretendida de modo a distribuir 200 μ L em cada poço.

As placas foram incubadas *overnight* para permitir a adesão das células aos poços.

4. Preparação dos meios condicionados e diluições

De forma a analisar a resposta da linha celular de fibroblastos humanos (HFF1) aos materiais para proteção pulpar direta nos ensaios de citotoxicidade (MTT, SRB e Citometria de fluxo), utilizando meios de cultura condicionados (de acordo com as diretivas da norma ISO 10993-5), foram efetuados três grupos: 1. Life® (KerrHawe, Bioggio, Switzerland), 2. White ProRoot® MTA (Densply, Maillefer, Tulsa Dental Specialties, Ballaigues, Switzerland) e 3. Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France).

Os materiais foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (tabela I).

Materiais	Composição	Manipulação	Lote
1. Life®	Pasta – hidróxido de cálcio, óxido de zinco, butil benzeno sulfonamida Catalizador – sulfato de bário, dióxido de titânio, salicilato de metila	Espatulação de acordo com as normas do fabricante	4989034
2. White ProRoot® MTA	Cimento portland 75% Óxido de bismuto 20% Sulfato de cálcio hidratado 5-1%	Dosagem de acordo com as normas do fabricante, mas a mistura efetuada em vibrador	13102906 12002493
3. Biodentine™	Silicato tricálcico - pó Solução aquosa de cloreto de cálcio e excipientes	Adição do líquido ao pó contido na cápsula; vibrador durante 30 segundos	B06932

Tabela I: Composição e manipulação dos diferentes grupos (grupo 1-Life®, grupo 2- White ProRoot® MTA e grupo 3 - Biodentine™)

De modo a diminuir riscos de contaminação durante os testes de citotoxicidade, os materiais foram diretamente colocados com uma espátula, sob condições assépticas na câmara de fluxo laminar, em placas de PVC com furos por forma a obter *pellets* com 3 mm de diâmetro e

1,5 mm de altura. De seguida, as placas foram colocadas na incubadora a 37°C com atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ durante 24 horas (Biodentine™) ou 72 horas (White ProRoot® MTA e Life®) de modo a permitir a tomada de presa dos materiais. De modo a diminuir os riscos de contaminação, os *pellets*, após terem sido removidos das placas de PVC e colocados em placas de 6 poços (figura 1), foram mantidos sob lâmpada UV durante 20 minutos em cada face.

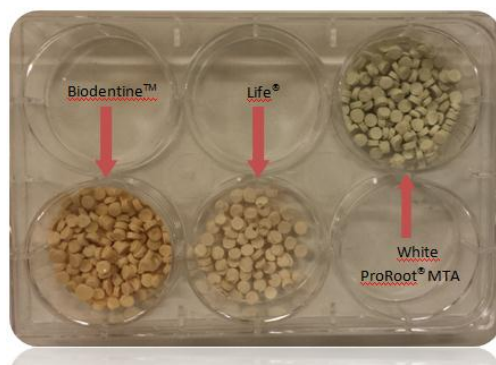


Figura 1: Distribuição dos materiais (cada poço contém um número conhecido de pellets).

De seguida, foram preparados os meios condicionados da seguinte forma: para cada material colocou-se um número conhecido de *pellets* em tubo de falcon com DMEM com 10% FBS, de forma a cumprir as recomendações da norma ISO 10993-5: 82,4 mm² de material por ml de meio de cultura. Posteriormente colocaram-se os falcon's com meio condicionado na incubadora, a 37°C durante 24 horas.

Após 24 horas, para cada solução com concentração inicial (1/1) foram realizadas quatro diluições (1/2; 1/4; 1/8; 1/16), onde metade do volume da solução inicial foi diluído em igual volume de DMEM com 10% de FBS num falcon, formando assim a diluição de 1/2 e assim sucessivamente (figura 2).

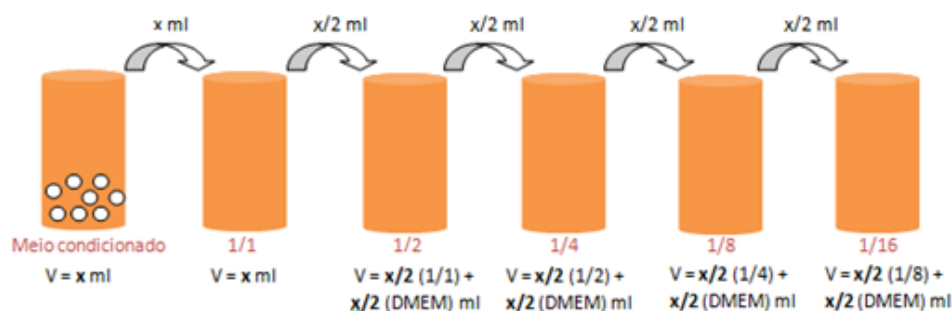


Figura 2: Esquema representativo da elaboração do meio condicionado e respectivas diluições.

5. Avaliação da atividade metabólica

Para os testes de citotoxicidade, os meios condicionados iniciais e as suas diluições foram colocados em contacto a linha celular de fibroblastos humanos (HFF1). Assim, 24 horas

após o plaqueamento, já com as células aderentes no fundo dos poços, o meio de cultura foi removido e as culturas celulares foram submetidas a 200µl de meio condicionado nas suas diluições de 1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 e 200µl de meio de cultura (DMEM com 10% FBS) – grupo controlo, sendo posteriormente colocadas a 37°C com atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ durante 24, 72 e 120 horas.

Após estes períodos, a atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio do 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), (5mg/ml; Sigma® M2128), um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade de células metabolicamente ativas reduzirem no meio intracelular o sal solúvel de tetrazólio, dando origem a cristais de formazan, que é um produto de cor azul escura, insolúvel em água.

Como já descrito, efetuou-se o ensaio do MTT em meio condicionado referente às 24, 72 e 120 horas. Para cada uma das análises (24, 72 e 120 horas) foram plaqueadas três placas de 96 poços (Sarstedt® 83.1835), cada uma delas contendo meio condicionado com Life®, White ProRoot MTA® e Biodentine™ nas diferentes concentrações e meio de cultura DMEM (10%FBS) como controlo. A distribuição das soluções nas placas de 96 poços está descrita nas figuras 3 e 4-I):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B							1/1					
C							1/2					
D							1/4					
E							1/8					
F							1/16					
G							CT					
H												

Figura 3: Exemplo da distribuição dos meios condicionados relativamente ao ensaio do MTT (para cada material e para cada tempo (24,72 e 120 horas) foi plaqueada uma placa semelhante à acima representada). CT- grupo controlo.

Em cada placa, dezoito poços foram distribuídos em seis linhas horizontais (três poços/linha). A cada poço foram adicionados 200µl de meio condicionado, seguindo-se a ordem de concentrações descrita na figura 3, sendo que à última linha (G), corresponde o controlo (DMEM 10%FBS). Em toda a volta, foi preenchida uma linha completa apenas com DMEM 10%FBS, de modo a garantir condições de humidade semelhantes entre os poços. O procedimento foi o seguinte: remoção do meio contido em cada poço e posterior lavagem de cada poço com 50µl de PBS; colocação, em cada poço com conteúdo celular, de 50 µl de

solução de MTT em PBS (figura 4-II), procedendo-se posteriormente à sua incubação no escuro, à temperatura de 37°C, durante toda a noite (*overnight*). No dia seguinte, após o período de incubação com a solução salina de MTT, foram adicionados 70 µl de uma solução de HCl 0,04M em isopropanol (isopropanol ácido) de forma a que os cristais insolúveis de formazan fossem dissolvidos. De forma a facilitar a dissolução, as placas ficaram em agitação por um período de 30 minutos e posteriormente efetuou-se a suspensão do conteúdo de cada poço com uma micropipeta (figura 4-III). A absorvância foi determinada a um comprimento de onda de 570nm, usando como referência o comprimento de onda de 620nm, num leitor automático de microplacas de cultura, utilizando o espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

Este ensaio colorimétrico constitui uma forma de avaliar a função mitocondrial, uma vez que o composto é reduzido por células metabolicamente ativas devido à ação das enzimas desidrogenases, principalmente através da ação do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, a succinato desidrogenase (SDH) ou succinato-coenzima Q redutase¹¹. Verifica-se que as desidrogenases, no meio intracelular, têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT e formar cristais de formazan, que é um produto de cor azul escura insolúvel em água. Estes cristais de formazan podem posteriormente ser solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos. Desta forma, a quantidade de cristais de formazan obtidos é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis.



Figura 4: Ampliação de placa de 96 poços (Sarstedt® 83.1835). I: após distribuição dos meios condicionados e DMEM 10%FBS; II: após colocação de solução de MTT em PBS; III: após uniformização dos cristais de formazan.

A atividade metabólica foi expressa em percentagem relativamente às culturas celulares controlo não submetidas a qualquer tratamento. A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de inibição nas culturas submetidas à ação dos materiais testados correlacionada com as culturas não tratadas.

6. Avaliação da viabilidade celular

O ensaio do SRB constitui um marcador de citotoxicidade muito sensível. A sulforodamina B (SRB) é um corante aniónico que se vai ligar às proteínas electrostaticamente. O corante fixado, medido fotometricamente após solubilização, correlaciona-se com o conteúdo proteico e, previsivelmente, com a viabilidade celular.

Foi efetuado o ensaio do SRB em meio condicionado referente às 24, 72 e 120 horas. Para cada análise da viabilidade celular (24, 72 e 120 horas) foram plaqueadas: uma placa com 96 poços (Sarstedt® 83.1835) contendo meio condicionado com Biodentine™ nas diferentes diluições e meio de cultura DMEM 10%FBS (controlo), e uma placa com 96 poços (Sarstedt® 83.1835), contendo meio condicionado com White ProRoot® MTA e Life® nas diferentes diluições e meio de cultura DMEM 10%FBS (controlo). (Figuras 5, 6 e 7-I).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B						1/2						
C						1/1						
D						1/8						
E						CT						
F												
G		Biodentine™										
H												

Figura 5: Exemplo da distribuição dos meios condicionados relativamente ao ensaio do SRB para o material Biodentine™ (para cada tempo (24,72 e 120 horas) foi plaqueada uma placa semelhante à acima representada). CT- grupo controlo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					1/2							
C					1/16							
D					1/8							
E					CT							
F												
G		White ProRoot® MTA				Life®						
H												

Figura 6: Exemplo da distribuição dos meios condicionados relativamente ao ensaio do SRB para os materiais White ProRoot® MTA e Life® (para cada tempo (24h,72h e 120 horas) foi plaqueada uma placa semelhante à acima representada). CT- grupo controlo.

Em cada placa, doze poços foram distribuídos em quatro linhas horizontais (três poços/linha) para cada material. A cada poço foram adicionados 200µl de meio condicionado, seguindo-se a ordem de concentrações observada na figura, sendo que a linha E corresponde ao controlo (DMEM 10%FBS). Em toda a volta, foi preenchida uma linha completa com apenas DMEM 10%FBS, de modo a garantir condições de humidade semelhantes entre os poços. Após remoção do meio contido em cada poço e posterior lavagem com 50 µl de tampão fosfato salino (PBS) em cada poço, promoveu-se a fixação das células através da adição, a cada poço, de 50 µl de ácido acético a 1% (em metanol 100%) e deixou-se repousar no frigorífico durante uma hora. Retirou-se a solução de fixação e lavou-se uma vez com água ultra-pura (de modo a remover os sais). De seguida, adicionaram-se 50 µl de SRB 0,4% (em ácido acético a 1%) (figura 7-II) e incubou-se à temperatura ambiente, protegendo da luz, durante toda a noite (overnight). Após isso, lavou-se com água corrente até se eliminar completamente o corante não ligado e deixou-se secar (durante trinta minutos). Adicionaram-se 100 µl de Tris.NaOH 10mM com pH igual a 10 (figura 7-III) e efetuou-se a leitura da absorvância a 540 nm, usando um filtro de referência de 690 nm num leitor automático de microplacas de cultura, utilizando o espectrofotómetro ELISA (Biotek® Synergy HT).

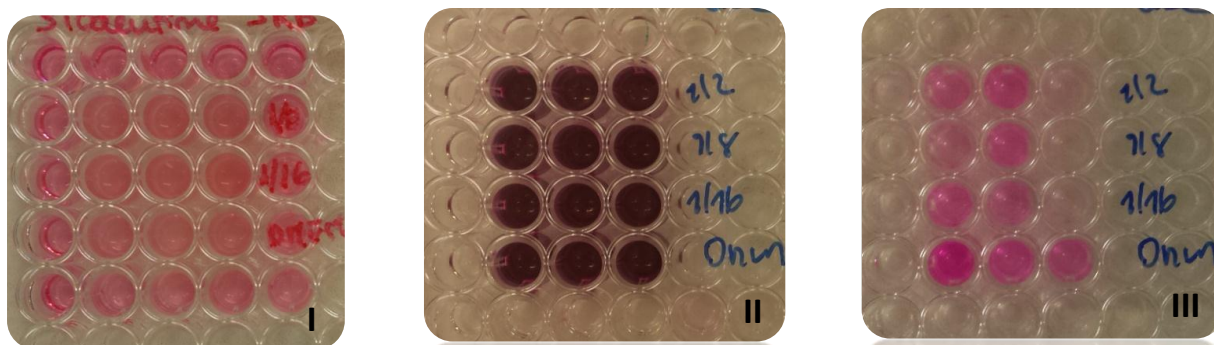


Figura 7: Ampliação de placa de 96 poços (Sarstedt® 83.1835). I: após distribuição dos meios condicionados e DMEM 10%FBS; II: após colocação da solução de SRB; III: após eliminação do corante não ligado.

7. Avaliação dos tipos de morte celular

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar células ou outras partículas biológicas microscópicas suspensas em meio líquido. Consiste num método que permite analisar simultaneamente, e num curto período de tempo, múltiplas características físicas e químicas de células em suspensão com recurso a um aparelho, com um feixe de luz de um único comprimento de onda que é direcionado para um meio líquido em fluxo. Vários detetores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz, um na linha do feixe de luz (*forward scatter*, FCS) e vários perpendiculares a este (*side scatter*, SSC), além de um ou mais detetores fluorescentes. Cada partícula suspensa que passa através do feixe dispersa a luz de uma forma específica, e os corantes químicos fluorescentes encontrados na partícula ou a ela ligados podem ser excitados emitindo luz de menor frequência (ou maior

comprimento de onda) do que o da fonte de luz. Esta combinação de luz dispersa e fluorescente é melhorada pelos detetores e, por análise das flutuações de brilho de cada detetor (uma para cada pico de emissão fluorescente), é possível explorar vários tipos de informação sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da complexidade interna da partícula (por exemplo a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana). Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para avaliar o efeito dos materiais utilizados (Biodentine™, White ProRoot® MTA e Life® ao nível da morte celular. Assim foram determinados e caracterizados os níveis de morte celular através da dupla marcação com a anexina V (AnV) ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com iodeto de propídeo (IP).

Para a realização dos estudos de citometria de fluxo as culturas celulares foram preparadas à semelhança do descrito para a avaliação da proliferação celular pelo ensaio do MTT e SRB. Resumidamente, as culturas celulares foram incubadas durante 24 e 72 horas em placas de 6 poços com 2,5mL da diluição dos meios condicionados de 1/8, escolhida com base nos resultados preliminares de avaliação da atividade metabólica pelo ensaio do MTT. Realizaram-se controlos (DMEM com 10% FBS) em todos os ensaios. Para a análise da morte celular foram utilizados dois fluorocromos diferentes, a An-V e o IP, que permitem quantificar a viabilidade celular distinguindo os diferentes tipos de morte celular, a necrose e a apoptose. A An-V permite identificar as células que se encontram em apoptose, pois este fluorocromo liga-se especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se desloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. De forma complementar, o IP é um corante que se intercala no DNA das células, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou necrose. Desta forma, recorrendo à dupla marcação com An-V/IP é possível distinguir quatro grupos de células: o grupo I, a que correspondem as células vivas; o grupo II, que engloba as células que se encontram em apoptose inicial; o grupo III, que associa as células que se encontram em apoptose tardia/necrose; e o grupo IV, que contém as células que se encontram em necrose. Deste modo, as células pertencentes ao grupo I, isto é, as células vivas, apresentam-se negativas tanto para a marcação com An-V como para a marcação com IP. As células incluídas no grupo II, em apoptose inicial, apresentam-se positivas para a marcação com An-V e negativas para a marcação com o IP. As células que se apresentam positivas para as duas marcações, significa que se encontram em apoptose tardia/necrose, pelo que compõem o grupo III, enquanto as células que se encontram em necrose e constituem o grupo IV apresentam-se negativas para a marcação com An-V e positivas para a marcação com o IP, de acordo com a tabela II:

Grupos	Anexina V	Iodeto de Propídeo
Grupo I		
Células vivas	-	-
Grupo II		
Células em apoptose inicial	+	-
Grupo III		
Células em apoptose tardia/necrose	+	+
Grupo IV		
Células em necrose	-	+

Tabela II: Padrões de marcação com An-/IP para os diferentes grupos de células.

Para marcação com An-V/IP, utilizaram-se células obtidas após centrifugação de uma suspensão celular a 300G durante 5 minutos. De seguida, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* uma vez com PBS. Posteriormente, o *pellet* foi incubado com 100µL de tampão de ligação (KIT Immunotech), 1µL de An-V-FITC (KIT Immunotech) e 5µL de IP (KIT Immunotech), durante 15 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 400µL de PBS e efetuou-se a análise no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525nm para a An-V-FITC e 640nm para o IP. Os resultados aparecem sob a forma de percentagem de células presentes em cada grupo.

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® Statistics, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). A análise descritiva das variáveis quantitativas em estudo foi realizada pelo cálculo de estimadores de tendência central, de dispersão e de localização.

Na análise inferencial, a normalidade de distribuição das variáveis quantitativas foi avaliada segundo o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação dos valores obtidos pelo ensaio MTT e SRB em cada condição com o controlo foi realizado utilizando o teste *t* de Student para uma média, comparando com o valor de padronização (100 para o teste MTT e 1 para o teste SRB). Nas comparações entre as condições experimentais duas a duas foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes no caso de haver normalidade da distribuição dos valores ou o teste de Mann-Whitney em caso contrário. Todas as comparações foram corrigidas pelo método de Bonferroni.

Foi considerado um erro tipo I de 0,05 para todas as comparações.

RESULTADOS

Avaliação da atividade metabólica

Para avaliação da atividade metabólica dos materiais utilizados em culturas celulares de fibroblastos humanos (HFF1), foram utilizados os meios condicionados e respectivas diluições, realizando-se posteriormente o ensaio do MTT. Este método determina a actividade metabólica celular. Ao grupo controlo, que cresce em condições ideais, foi-lhe atribuído o valor de 100%. Os resultados expressam a média de pelo menos quatro ensaios. Na figura 8 está representada graficamente a dose-resposta aos meios condicionados com as respectivas diluições, para cada um dos materiais às 24h, 72h e 120h, após a sua administração nas culturas celulares.

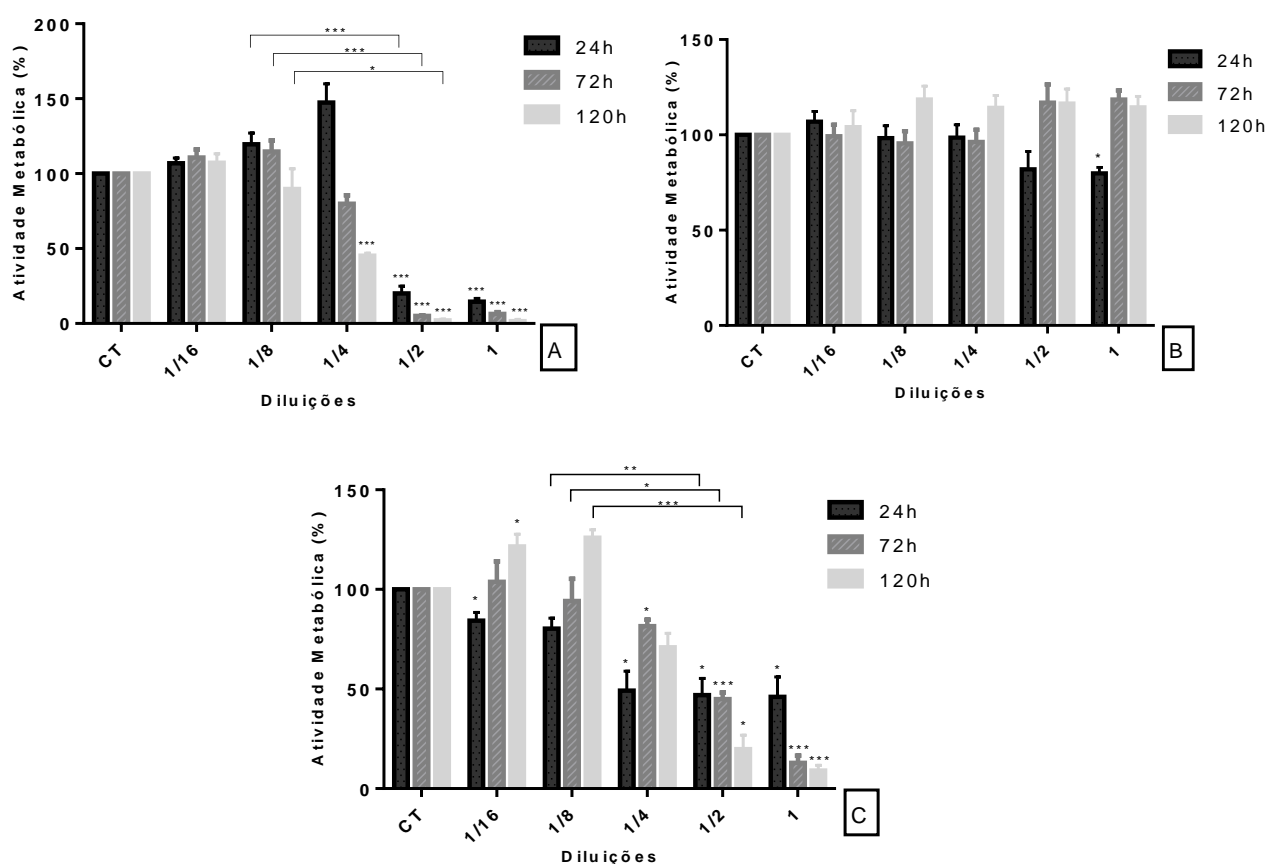


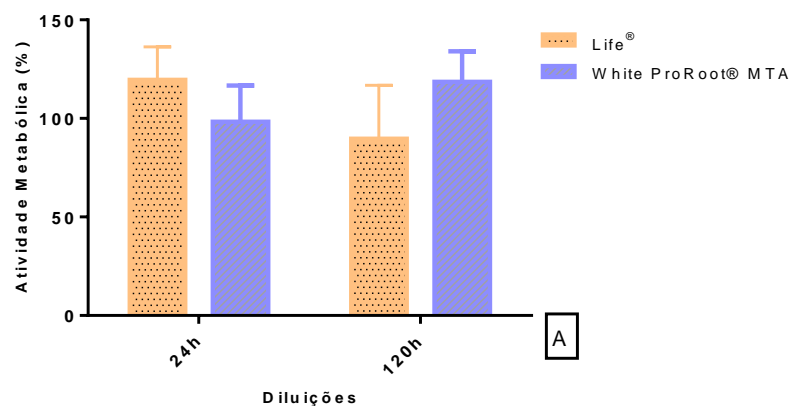
Figura 8: Atividade metabólica das células sujeitas aos meios condicionados e respectivas diluições para o ensaio do MTT. A) Life®; B) White ProoRoot® MTA; C) Biodentine™. O meio condicionado inicial foi sequencialmente diluído em meio de cultura celular. As células foram expostas por um período de 24, 72 e 120 horas. Os resultados expressam a média de pelo menos quatro ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo e entre diluições (1/2 e 1/8) estão assinaladas com * (P<0,05); ** (P<0,01) ou *** (P<0,001).

De uma forma geral, verifica-se que a atividade metabólica dos materiais aumenta com o aumento das diluições efetuadas (tornando-se o meio sucessivamente menos concentrado). No entanto, no caso do White ProoRoot® MTA, para diluições iniciais (1 e 1/2) não se verifica uma

diminuição da atividade metabólica significativa relativamente ao grupo controlo, excepto para as 24 horas na diluição igual a 1 ($p=0,015$). Este material apresenta uma atividade metabólica relativamente constante, com pequenas oscilações, não apresentando diferenças estatisticamente significativas com o grupo controlo nas restantes diluições e tempos avaliados. Relativamente ao Life[®], verificam-se diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo, para diluições iniciais em todos os tempos (às 24 e 72 horas para as diluições de 1 e 1/2 ($p<0,001$) e às 120 horas para as diluições de 1, 1/2 e 1/4 ($p<0,001$)), observando-se uma atividade metabólica diminuída. De forma semelhante, o Biodentine[™] também apresenta diminuição da atividade metabólica e diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo, para diluições iniciais em todos os tempos (às 24 horas nas diluições de 1, 1/2 e 1/4 ($p=0,015$); às 72 horas nas diluições de 1 e 1/2 ($p<0,001$) e na diluição de 1/4 ($p<0,045$); às 120 horas nas diluições de 1 ($p<0,001$) e 1/2 ($p=0,015$)). Para a diluição de 1/16 também se verificam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (às 24 e 72 horas $p=0,045$), sendo que às 120 horas se verifica um aumento da atividade metabólica e não uma diminuição desta.

Numa análise entre diluições (1/2 e 1/8) verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas tanto para o Life[®] como para o Biodentine[™]. Para o Life[®], às 24 e 72 horas ($p<0,001$) e às 120 horas ($p=0,015$). Para o Biodentine, às 24 horas ($p=0,006$), às 72 horas ($p=0,015$) e às 120 horas ($p<0,001$). No caso do White ProRoot[®] MTA não existem diferenças estatisticamente significativas entre as diluições (1/2 e 1/8).

Na figura 9 estão representados os resultados comparativos que expressam a dose-resposta da utilização dos meios condicionados na diluição de 1/8 para cada um dos materiais às 24 e 120 horas.



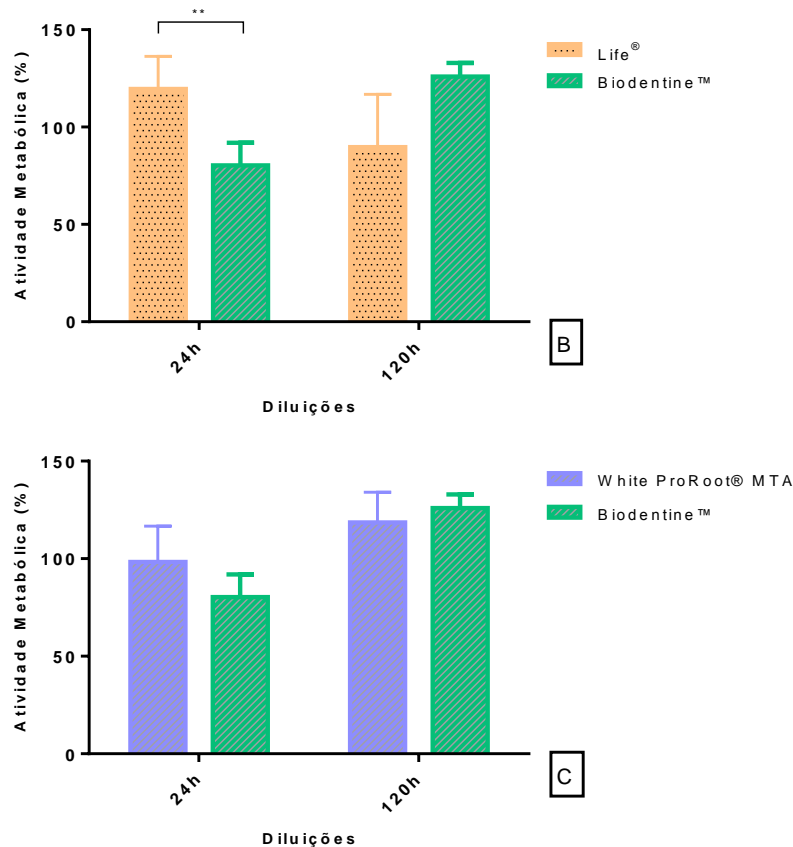


Figura 9: Atividade metabólica das células sujeitas ao meio condicionado na diluição de 1/8 comparativamente a diferentes materiais e em diferentes tempos (24 e 120 horas). A) Life® vs White ProRoot® MTA; B) Life® vs Biodentine™; C) White ProRoot® MTA vs Biodentine™. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * (P<0,05); ** (P<0,01) ou *** (P<0,001).

Em relação à análise comparativa da actividade metabólica entre materiais, no caso do Life® vs White ProRoot® MTA, para a diluição de 1/8, apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas, verifica-se que inicialmente ocorre um aumento da actividade metabólica do Life® (119,52%±7,49) e que tendencialmente diminui ao longo do tempo (120 horas) (89,71%±13,52). Pelo contrário, o White ProRoot® MTA mantém a actividade metabólica inicial perto de 100% (98,32%±6,48) e esta aumenta às 120 horas (118,61%±5,16). Comparando o Life® e o Biodentine™, para a mesma diluição, apenas se verificam diferenças estatisticamente significativas às 24 horas (p=0,005). O Life® mantém a sua actividade como anteriormente referido e, o Biodentine, inicialmente diminui a actividade metabólica para 80,31%±4,41, a qual aumenta às 120 horas (125,93%±4,02). Em relação ao White ProRoot® MTA e ao Biodentine™ não se verificam diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos tempos avaliados.

Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular dos materiais utilizados em culturas celulares de fibroblastos humanos, foram utilizados os meios condicionados e respectivas diluições determinadas com base nos resultados preliminares de avaliação da atividade metabólica pelo ensaio do MTT, realizando-se posteriormente o ensaio do SRB. A sulforodamina B (SRB) é um corante aniónico que se vai ligar às proteínas electrostaticamente e, o corante fixado, medido fotometricamente após solubilização, correlaciona-se com o conteúdo proteico. Ao grupo controlo, que cresce em condições ideais, foi-lhe atribuído o valor de 100%. Os resultados expressam a média de pelo menos quatro ensaios. Na figura 14 está representada graficamente a dose-resposta da utilização dos meios condicionados e respectivas diluições para cada um dos materiais às 24, 72 e 120 horas, após a sua administração nas culturas celulares.

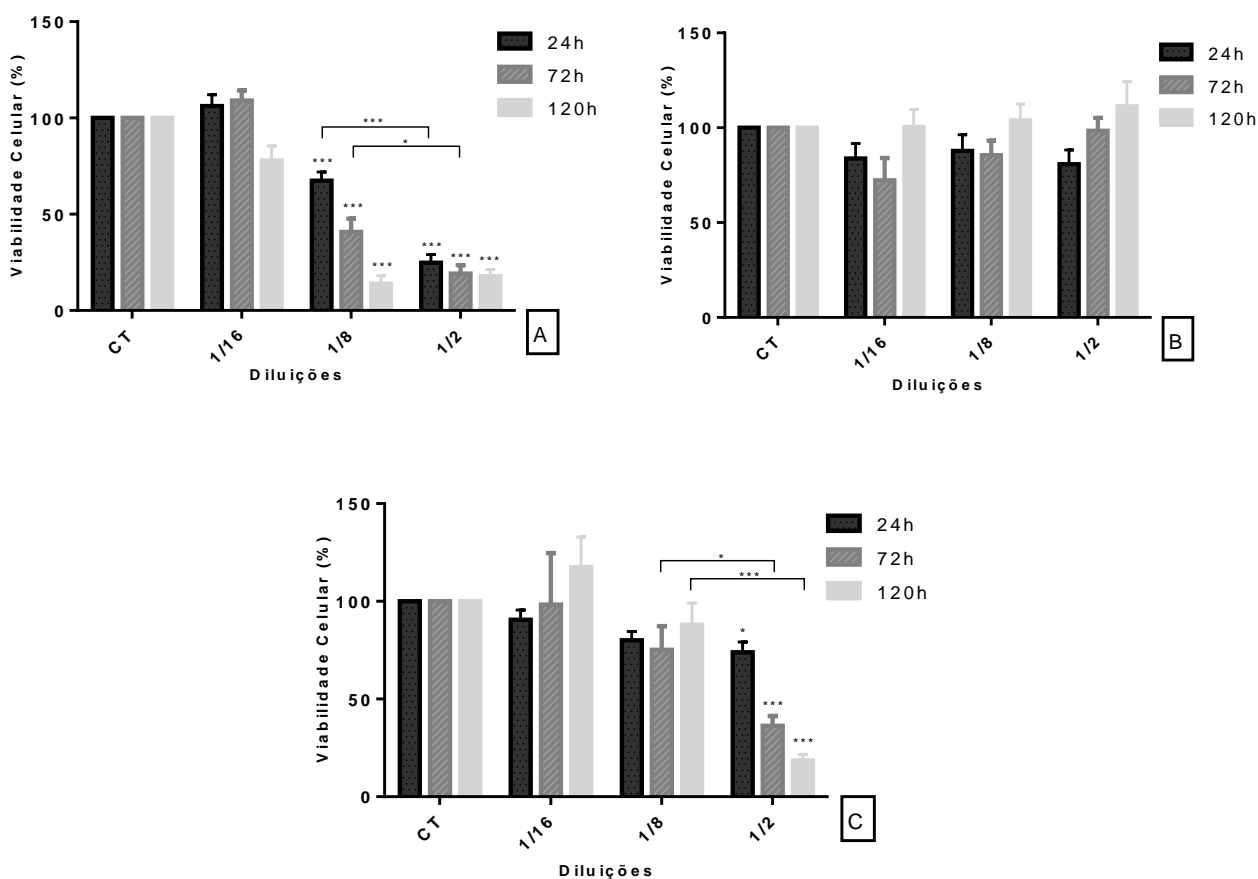


Figura 10: Viabilidade das células sujeitas aos meios condicionados e respectivas diluições para o ensaio do SRB. A) Life®; B) White ProoRoot® MTA; C) Biodentine™. O meio codicionado inicial foi sequencialmente diluído em meio de cultura celular. As células foram expostas por um período de 24, 72 e 120 horas. Os resultados expressam a média de pelo menos quatro ensaios. As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo e entre diluições (1/2 e 1/8) estão assinaladas com * (P<0,05); ** (P<0,01) ou *** (P<0,001).

Pela avaliação da viabilidade celular através do ensaio do SRB, verifica-se um comportamento tendencialmente semelhante dos materiais, comparativamente à avaliação da

atividade metabólica pelo ensaio do MTT. Numa análise geral, a viabilidade celular do Life[®] e do Biodentine[™] aumenta com o aumento das diluições efetuadas e diminui com o tempo (Life[®]). No caso do Biodentine[™], esta última observação em relação ao tempo não se verifica tão linearmente. Em relação ao White ProRoot[®] MTA não se verificam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo em nenhum dos tempos observados nem em nenhuma das diluições. Este material apresenta uma viabilidade celular elevada, mesmo em baixas diluições, com tendência a aumentar ao longo do tempo. Verificam-se diferenças estatisticamente significativas do Life[®] em relação ao controlo, na diluição de 1/2 e 1/8, em todos os tempos ($p < 0,001$) e do Biodentine[™] na diluição de 1/2 em todos os tempos, isto é, às 24 horas ($p = 0,030$) e às 72 e 120 horas ($p < 0,001$).

Numa análise entre diluições (1/2 e 1/8) verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas tanto para o Life[®] como para o Biodentine[™]. Para o Life[®], às 24 horas ($p < 0,001$) e às 72 horas ($p = 0,045$). Para o Biodentine[™], verificam-se diferenças estatisticamente significativas às 72 horas ($p = 0,012$) e às 120 horas ($p < 0,001$). No caso do White ProRoot[®] MTA, tal como se verificou no ensaio do MTT, não existem diferenças estatisticamente significativas entre as diluições (1/2 e 1/8).

Na figura 11 estão representados os resultados comparativos da dose-resposta relativa à utilização dos meios condicionados na diluição de 1/8 para cada um dos materiais às 24 e 72 horas.

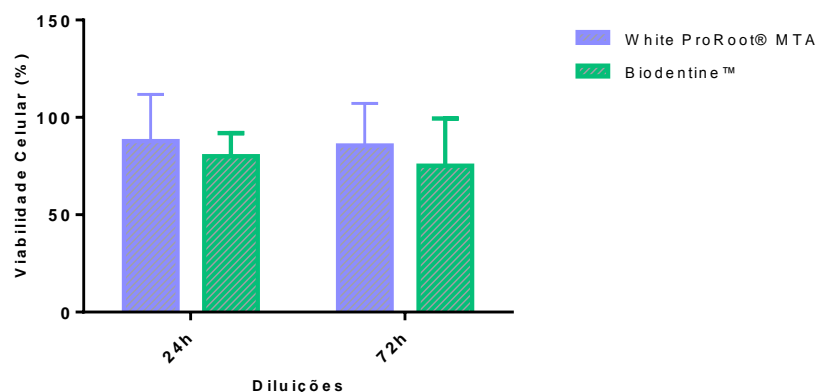


Figura 11: Viabilidade das células sujeitas ao meio condicionado na diluição de 1/8 comparativamente a diferentes materiais e em diferentes tempos (24 e 72 horas). A) Life[®] vs White ProRoot[®] MTA; B) Life[®] vs Biodentine[™]; C) White ProRoot[®] MTA vs Biodentine[™]. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas com * ($P < 0,05$); ** ($P < 0,01$) ou *** ($P < 0,001$).

Em relação à análise comparativa da viabilidade celular entre o White ProRoot[®] MTA e o Biodentine[™], tal como anteriormente verificado no ensaio do MTT, também não se verificam diferenças estatisticamente significativas. Neste caso, verifica-se uma viabilidade celular semelhante para o White ProRoot[®] MTA ($87,87\% \pm 8,48$ às 24 horas e $85,62\% \pm 7,60$ às 72 horas)

e uma ligeira diminuição da viabilidade celular inicial para o Biodentine™ (80,12±4,45), que aumenta às 72 horas (88,11%±11).

Avaliação dos tipos de morte celular

A avaliação dos tipos de morte celular foi realizada por citometria de fluxo, recorrendo à dupla marcação com AnV-FITC e IP (figura 12). Esta marcação permite distinguir diferentes populações celulares: células vivas, células em apoptose, células em apoptose tardia e necrose e células em necrose. Esta avaliação realizou-se em culturas celulares de fibroblastos humanos e foi utilizado o meio condicionado na diluição de 1/8, escolhida com base nos resultados preliminares de avaliação da atividade metabólica pelo ensaio do MTT.

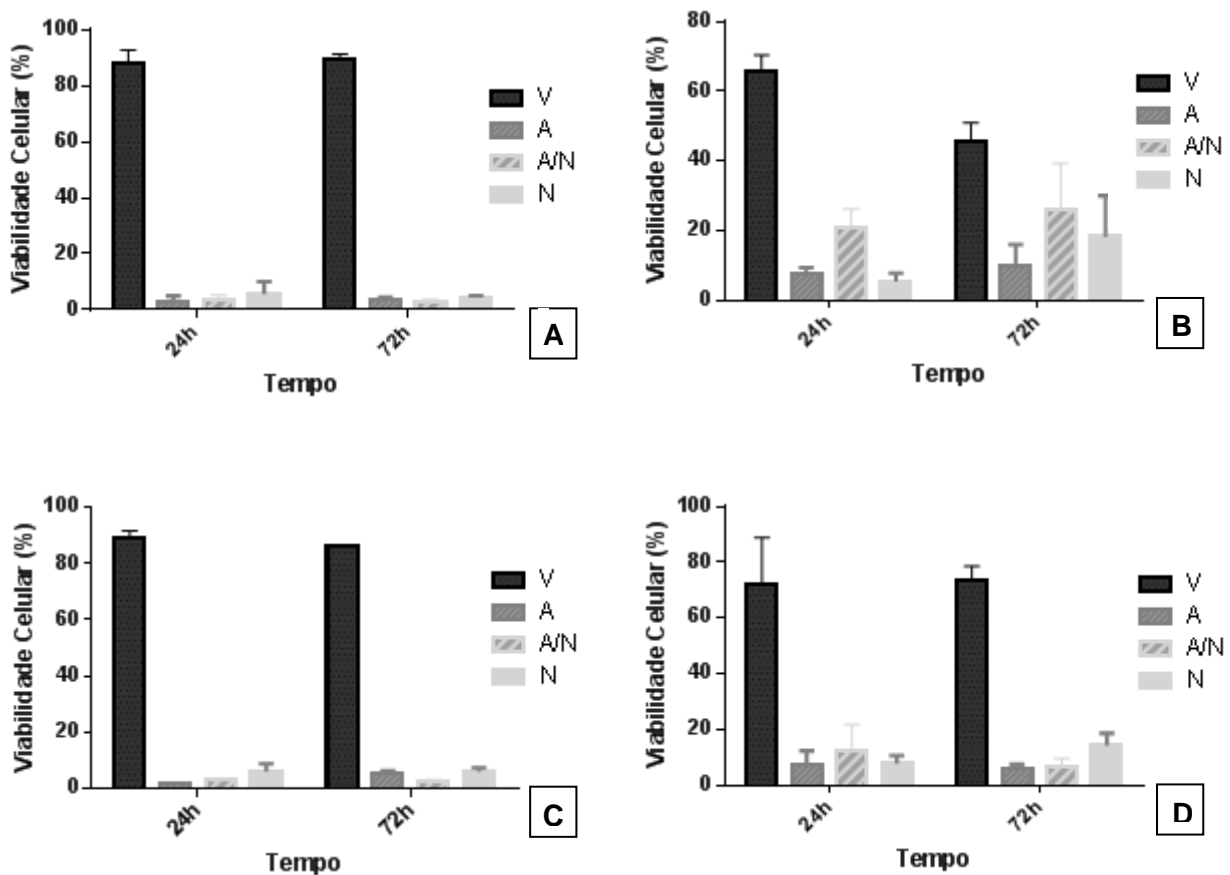


Figura 12: análise da viabilidade celular por citometria de fluxo com a dupla marcação AnV / IP. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células viáveis, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e necrose para os tempos avaliados (24 e 72 horas) para cada um dos materiais e controlo. A) Controlo; B) Life®; C) White ProRoot® MTA; D) Biodentine™. Os valores obtidos resultam da média de ensaios preliminares com n=4 para os materiais Life® e Biodentine™ (duas experiências independentes) e n=2 para o material White ProRoot® MTA em que foi realizada apenas uma experiência. **V**: células vivas; **A**: células em apoptose; **A/N**: células em apoptose tardia/necrose; **N**: células em necrose.

Os resultados obtidos com este ensaio, corroboram de uma forma geral os resultados obtidos nos ensaios anteriores. Este ensaio, para além de permitir avaliar a percentagem de células viváveis, permite igualmente perceber qual o tipo de morte celular das células não viáveis, resultando num valor total (células viáveis + células não viáveis) de 100%. O White ProRoot[®] MTA mostrou ser o material menos citotóxico apresentando os valores mais altos de células viáveis para ambos os tempos (89%±2,83 para as 24 horas e 86% para as 72 horas). Dentro da pequena percentagem de morte celular, verifica-se que, em ambos os tempos, ocorreu principalmente morte celular devido a necrose (6%±2,83). No caso do Biodentine[™], verifica-se uma percentagem de células viáveis de 72,3%±16,5 (24 horas) e de 73,4%±5,13 (72 horas). Em termos de morte celular, às 24 horas verifica-se essencialmente morte devido a apoptose tardia/necrose (12,5%±9,26), ao contrário das 72 horas em que se verifica maioritariamente morte celular devido a necrose (14,2%±4,44). Finalmente, o material que mostrou menor percentagem de células viáveis em ambos os tempos foi o Life[®]. Em termos de células viáveis, apresentou uma percentagem de 65,8%±4,60 às 24 horas, diminuindo esta para 45,8%±5,17 às 72 horas. A morte celular corresponde essencialmente a apoptose tardia/necrose tanto às 24 horas (21%±5,24) como às 72 horas (26,2%±13,1). No entanto, neste último tempo, também se verifica uma percentagem razoável de morte celular devido necrose (18,2%±11.8).

DISCUSSÃO

Segundo a *American Dental Association* os testes de citotoxicidade com recurso a células são meios aceites para testar a biocompatibilidade dos materiais dentários. Alguns avanços neste tipo de testes têm vindo a oferecer métodos mais precisos para avaliação de novos materiais e compreensão dos seus mecanismos de resposta *in vivo*, aumentando a segurança na sua utilização, já que o contacto célula/material pode simular as condições *in vivo*. São várias as vantagens associadas aos testes de citotoxicidade *in vitro* comparativamente aos estudos em animais e estudos clínicos em humanos, nomeadamente a possibilidade de controlo do ambiente químico como o pH, temperatura e pressão; o controlo de condições fisiológicas como as concentrações de nutrientes e hormonas; a preservação; a validação da origem; o historial e pureza que podem ser autenticadas e registadas; a replicação e variabilidade; o controlo da dose, concentração e tempos de exposição; o menor custo; os resultados mais rápidos; a ausência de questões éticas e a padronização da metodologia ^(2, 23, 49). Contudo é reconhecido que estes testes apresentam algumas limitações como a utilização de células em monocamadas, o que não é fisiológico e não reproduz a arquitectura tecidual *in vivo*, na qual as células basais podem ajudar na reparação da agressão à superfície. Deste modo, estes testes decorrem sem qualquer contacto com o organismo e as várias interações complexas, que constituem a resposta biológica, estão ausentes. Além disso, deve ser tido em conta que a presença de efeito citotóxico *in vitro* não garante que o material seja citotóxico quando aplicado *in vivo* ^(42, 49). Deste modo, uma particular preocupação deve ser tomada na extrapolação dos resultados obtidos *in vitro* para as condições *in vivo*.

Diferentes tipos de células podem ser utilizados para testes *in vitro*, sendo que estas podem ser provenientes de linhas imortalizadas ou de linhas primárias. As linhas celulares já estabelecidas têm a vantagem de melhorar a reprodutibilidade dos resultados e são recomendadas pela *International Organization for Standardization* (ISO) para uma avaliação primária da citotoxicidade ⁽⁵⁰⁾. Os fibroblastos, são o tipo celular mais predominante no tecido pulpar e desempenham um papel fundamental na defesa deste, mediando a resposta inflamatória. São também as células mais utilizadas para o estabelecimento de linhas celulares permanentes e, portanto, utilmente utilizadas em estudos de citotoxicidade de diversos compostos ^(35, 49). Desta forma, foi utilizada uma linha celular de fibroblastos humanos (HFF1).

Neste estudo foi utilizada a metodologia dos meios condicionados, em que foram feitas diferentes diluições dos materiais de modo a obter uma relação dose-resposta ⁽³⁰⁾. Apesar de não se optar por um contacto direto material-célula, a grande vantagem de utilização desta técnica passa pela possibilidade dos produtos libertados pelos meios condicionados em contacto com as culturas celulares e respetivas diluições, poderem manter uma relação com a citotoxicidade celular, tendo em conta dois parâmetros essenciais: diluição e tempo. Para além disso é reportado na literatura que há uma inibição do crescimento celular aquando o contacto direto

material-célula ⁽⁵²⁾. Além disso, é importante referir que os resultados da citotoxicidade obtidos para um mesmo ensaio podem variar, para o mesmo material, devido a diferentes condições experimentais, tais como a utilização de diferentes linhas celulares, o tipo de técnica utilizada, a concentração dos extratos, a preparação do material e o seu tempo de presa (utilização do material com ou sem presa completa) e o tempo de exposição ao meio de cultura.

Com os resultados de espectrofotometria obtidos pelo ensaio do MTT e SRB, no caso do Life[®], podemos verificar que à medida que a concentração do meio condicionado diminui, isto é, fica sucessivamente mais diluído, a atividade metabólica e viabilidade celular dos fibroblastos (HFF1) aumenta. Verifica-se também que, ao longo do tempo, tanto a actividade metabólica como a percentagem de células viáveis diminui, apresentando valores superiores às 24 horas, que tendencialmente diminuem até as 120 horas. Vários estudos se propuseram a avaliar a citotoxicidade do HC ^(23, 27, 34, 50, 51, 52, 55). Atualmente reconhece-se que a formação de dentina reparadora em resposta a este material pode não ser devido à capacidade bioindutiva do HC, mas sim devido ao resultado de um mecanismo de defesa da polpa induzida pela natureza irritante deste material. Sabe-se, também, que a resposta inflamatória induzida pelo HC é elevada e a citotoxicidade deste material é devida essencialmente ao seu elevado pH, solubilidade e libertação de iões hidroxilo, conduzindo a morte celular por necrose ⁽²³⁾. Num estudo em que utilizam igualmente meios condicionados, o HC mostrou ser o mais citotóxico comparativamente aos restantes materiais (White MTA, Gray MTA, castor oil bean cement (COB) e Vitrebond). Nesse estudo, tal como os resultados aqui observados (e apesar de apenas considerarem um período de observação de 24 horas), verifica-se que a viabilidade celular, de uma forma geral, também aumenta com a diminuição da concentração do composto no meio ⁽²³⁾. Num outro estudo, utilizando células da polpa de rato em contacto indireto com diferentes materiais, verifica-se que o HC provoca elevados níveis de citotoxicidade, aumentando ao longo do tempo (após 72 horas quase todas as células se tornaram inviáveis) ⁽⁵²⁾. Da mesma forma, Hirschman et al. verificaram, através do ensaio do MTT, que utilizando uma linha celular de fibroblastos humanos sob meios condicionados, o HC mostrou ser o material para proteções pulpares diretas mais citotóxico, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Verificou-se igualmente que essa citotoxicidade aumenta ao longo do tempo (dois, cinco e oito dias) ⁽⁵⁵⁾.

Os ensaios do MTT e SRB dão alguma informação acerca da função mitocondrial e viabilidade celular, respetivamente. No entanto, estes ensaios não revelam as alterações que conduzem à ativação das vias de morte. Para tal avaliação recorreu-se à citometria de fluxo, através da dupla marcação com An-V/IP. No caso do Life[®], às 24 horas verificou-se morte celular devido essencialmente a apoptose tardia/necrose. Às 72 horas, a percentagem de células vivas diminui, mantendo-se a tendência de morte celular devido a apoptose tardia/necrose. No entanto

podemos verificar o aumento da percentagem de células que morreram devido a necrose (18,2%).

Sabe-se que a exposição das células a agentes citotóxicos pode conduzir a necrose ou apoptose. Durante a necrose, verifica-se um colapso da membrana citoplasmática e as células sofrem lise. A apoptose é geralmente caracterizada por um colapso interno dos organelos, uma desintegração da membrana plasmática em corpos vesiculares apoptóticos e a destruição do material genético ⁽²⁷⁾. A eliminação celular das células por apoptose não é detetada pelo sistema imunológico, enquanto que, a eliminação do conteúdo intracelular das células necróticas para o espaço extracelular origina uma resposta inflamatória. A apoptose é essencialmente uma morte celular programada, não afetando as células vizinhas. Wheeler et al., num estudo com fibroblastos humanos sob a acção de meio condicionado com HC, verificaram que a exposição dos produtos solúveis à linha celular testada provocou uma toxicidade significativa, bem como danos na membrana celular e interrupção da mitose ⁽⁵⁶⁾. Como já referido anteriormente, essa citotoxicidade está relacionada com a solubilidade e libertação contínua de HC devido ao seu elevado pH ^(34, 50, 51). Desta forma, verifica-se que este composto, quando em contacto direto com as células pulpares, induz a formação de uma camada celular necrosada por coagulação (zona de cauterização). Essa camada celular mais superficial sofre morte celular devido, essencialmente, a necrose, ocorrendo uma resposta inflamatória dos tecidos envolventes, nos quais, o tecido pulpar subjacente irá ser o responsável pela reparação. Esta está associada à formação de uma barreira de tecido duro com uma organização porosa ^(34, 38, 51), como já referido. Infelizmente o processo de regeneração do tecido pulpar não pode ser observado neste estudo *in vitro*. Aqui, apenas estão disponíveis células dispostas em monocamadas, em que os padrões de citotoxicidade poderão estar sobrevalorizados e não diretamente relacionados com o modelo *in vivo*.

Relativamente ao MTA, a literatura mostra-se coerente acerca dos seus padrões de biocompatibilidade vindo, deste modo, a corroborar os resultados obtidos neste estudo. De acordo com os resultados obtidos pelos ensaios do MTT e SRB, podemos verificar que o White ProRoot[®] MTA mantém um padrão relativamente constante ao longo tempo e em diferentes diluições, no que se refere à actividade metabólica e viabilidade celular dos fibroblastos. Nos ensaios referidos não existem diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controlo (apenas para no ensaio do MTT, na diluição igual a 1 às 24 horas). Verifica-se que, mesmo com o meio condicionado mais concentrado, a atividade metabólica e viabilidade celular apresenta valores próximos de 100%, sendo que, apesar de não ser estatisticamente significativa, observa-se uma tendência de diminuição da citotoxicidade ao longo do tempo. Também não se observaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre diferentes diluições. Estes factos podem comprovar a limitada libertação de componentes citotóxicos para o meio de cultura, que poderá ser o principal responsável pela insignificante toxicidade deste material ⁽⁵²⁾. De acordo com diversos estudos, o MTA apresenta um efeito

citotóxico limitado, com resultados favoráveis quando comparado a outros materiais com a mesma aplicação clínica ^(23, 27, 34, 50-52, 54, 55). Como vimos no caso do HC, a intensa libertação de componentes tóxicos pode resultar em profunda área de necrose pulpar adjacente ao material, o que pode interferir negativamente com a capacidade de reparação do tecido pulpar. O MTA, tal como o HC, apresenta um pH alcalino responsável pela libertação de iões cálcio. Apesar da libertação de componentes alcalinos do MTA branco relativamente ao MTA cinzento ainda não estar totalmente esclarecida, pensa-se que o White ProRoot[®] MTA apresente menor libertação desses componentes alcalinos relativamente ao HC, mesmo após a sua manipulação ⁽⁵⁰⁾. Sabe-se, também, que o MTA branco apresenta menor concentração de Fe₂O₃ (0,15%) relativamente ao cinzento (2,5%) ⁽⁵⁷⁾. Desta forma, a aplicação desse material sobre as polpas expostas causará danos iniciais limitados ao tecido pulpar, resultando numa fina camada de necrose imediatamente adjacente ao material, e, assim, permitindo ou mesmo participando diretamente no processo de reparação num período de tempo mais curto e sem perda excessiva do tecido local, favorecendo a manutenção da elevada capacidade de reparação pulpar ⁽²⁸⁾.

Neste estudo os materiais foram utilizados com presa completa. Não foi possível a avaliação sem presa devido, essencialmente, às dificuldades de manuseamento para padronização das dimensões dos materiais para a aplicação desta técnica. No entanto, seria interessante avaliar os diferentes padrões de citotoxicidade dos materiais com e sem presa numa perspectiva futura. Apesar disso, poderá prever-se que a citotoxicidade dos materiais seja maior quando este é recém-manipulado, libertando mais componentes citotóxicos no meio aquoso. Contudo, num estudo de Yasuda et al., não foram observadas diferenças de citotoxicidade entre o MTA recém-manipulado e com presa completa nos ensaios preliminares realizados ⁽⁵²⁾. Esta característica é importante devido ao longo tempo de presa deste material (165±5 minutos) em contacto direto com o tecido pulpar.

Num estudo *in vitro*, utilizando células de rato tipo odontoblasto (MDPC-23) e células indiferenciadas da polpa (OD-21) verificou-se, através de citometria de fluxo, que o White ProRoot[®] MTA não induz apoptose celular e, por outro lado, estimula o aumento da síntese de DNA. Neste estudo, também não são observadas diferenças entre a morfologia das células sujeitas ao material com ou sem presa, comparativamente ao grupo controlo. É interessante verificar que ocorre um aumento da percentagem celular na fase S (síntese de DNA) e na fase G2 (para as células MDPC-23) e aumento da fase S na linha celular OD-21. Apesar deste estudo ter algumas limitações (o facto da membrana interposta entre o material-células não representa o efeito direto do material), pode-se observar o papel do MTA na sobrevivência celular e atividade mitótica. A proliferação de células tipo odontoblasto e indiferenciadas da polpa pode explicar em parte a capacidade do MTA induzir a formação de uma ponte dentinária (indutor de dentinogénese), participando no processo de regeneração do complexo dentino-pulpar ⁽²⁷⁾. Num outro estudo utilizando células humanas da polpa (DPCs) verificou-se que o contacto direto favoreceu o aumento de secreção de fatores de crescimento vasculares endoteliais e induziu a

expressão osteo/dentinogénica nas DPCs, ocorrendo diferenciação em células tipo odontoblasto (28).

Nos ensaios de citometria de fluxo realizados no presente estudo, a grande percentagem de células viáveis às 24 e 72 horas (cerca de 90%), corrobora estudos anteriores efetuados e, a pequena percentagem de morte celular devido essencialmente a necrose, poderá corresponder à libertação inicial de iões cálcio. No entanto, não poderão ser tiradas conclusões assertivas acerca deste ensaio, uma vez que para este material apenas foi realizado um ensaio, constituindo um estudo preliminar.

Numa análise comparativa entre o Life[®] e o White ProRoot[®] MTA, na diluição de 1/8, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, verifica-se um ligeiro aumento da atividade metabólica no caso do Life[®] às 24 horas. Essa observação poderá corresponder à reação inflamatória inicial provocada por este material, verificando-se às 120 horas uma diminuição da actividade metabólica, manifestando os seus efeitos citotóxicos ao longo do tempo, como anteriormente referido. O White ProRoot[®] MTA inicialmente mantém valores próximo de 100%, reportando a sua função inerte sob as células, e às 120 horas observa-se um aumento da atividade metabólica que poderá estar relacionada com a sua capacidade indutiva na regeneração do complexo dentino-pulpar.

No caso do Biodentine[™], através dos resultados obtidos pelo ensaio do MTT e SRB, podemos verificar que para concentrações iniciais (1, 1/2 e 1/4 - MTT e 1/2 - SRB) a percentagem de atividade metabólica e viabilidade celular é bastante inferior às restantes diluições. Neste caso, também é possível verificar que à medida que o meio condicionado se torna sucessivamente mais diluído, a atividade metabólica e viabilidade celular dos fibroblastos aumenta. Verifica-se também que, ao longo do tempo, tanto a atividade metabólica como a percentagem de células viáveis tendencialmente aumenta, apresentando valores inferiores às 24 horas, que aumentam às 120 horas. De acordo com alguns estudos, a viabilidade celular está dependente da diluição efetuada (30, 58). Num estudo recente, em cultura celular de hDPSCs (human dental pulp stem cells), verificou-se que para o Biodentine[™], concentrações mais altas levaram a maior citotoxicidade. Apenas as concentrações de 2mg/ml e 0,2mg/ml levaram ao aumento da proliferação e viabilidade celular que, tal como os resultados obtidos neste estudo também aumentou ao longo do tempo. Para concentrações mais elevadas (20mg/ml) houve uma diminuição da proliferação celular e, para concentrações mais baixas (0,02mg/ml) ocorreu um efeito insignificante. As células utilizadas neste estudo são reconhecidas por responderem ao dano causado através da proliferação, migração, diferenciação e adesão de modo a repor os odontoblastos perdidos, principalmente através da síntese e secreção de dentina terciária (58).

Alguns estudos propuseram-se a analisar a citotoxicidade do Biodentine[™], fazendo muitos deles, comparação com o “*gold standard*” MTA (30, 36, 38, 45-47, 53, 54, 58, 59). Na grande maioria, independentemente da linha celular ou metodologia utilizada, referem que o Biodentine[™] tem uma eficácia semelhante ao MTA, podendo constituir uma alternativa viável devido às suas

vantagens em termos da manipulação, propriedades físicas e tempo de presa. Referem ainda que, ambos os materiais, são livres de inflamação e induzem a dentinogénese, levando à formação de uma ponte dentinária compacta ^(36, 38, 53, 59). A indução de dentinogénese poderá também estar relacionada com uma modulação na secreção de TGF- β 1 das células da polpa ⁽⁵³⁾. No estudo que efetuámos, uma comparação direta do Biodentine™ com os restantes materiais, para o ensaio do MTT, permite observar uma diminuição da atividade metabólica inicial, recuperando e aumentando às 120 horas. Apenas se encontram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre o Life® e o Biodentine às 24 horas, em que há um aumento inicial da actividade metabólica no Life® e uma diminuição no Biodentine™. Comparativamente ao White ProRoot® MTA, verifica-se a mesma tendência no MTT e SRB, sem diferenças estatisticamente significativas em cada ensaio, no entanto, conseguimos aperceber do papel inerte do White ProRoot® MTA às 24 horas comparativamente ao Biodentine™. Tendencialmente, em ambos, aumentam a atividade metabólica e viabilidade celular ao longo do tempo.

Alguns estudos recentes verificaram que o Biodentine™ inicialmente induz uma diminuição da viabilidade e proliferação celular ^(46, 47, 59). Corral Nuñez et al., observaram uma diminuição da viabilidade celular inicial que depois é recuperada às 24 horas, comparativamente ao controlo. Às 72 horas a viabilidade dos fibroblastos é semelhante no Biodentine™ e MTA ⁽⁵⁹⁾. Da mesma forma, Zanini et al., verificaram uma diminuição inicial significativa na proliferação das células OD-21, que progressivamente aumenta ao longo do tempo ⁽⁴⁶⁾. Algumas justificações poderão ajudar a compreender estes factos. No que se refere à diminuição da proliferação e viabilidade celular inicial, pensa-se que poderá estar relacionada com uma possível libertação de hidróxido de cálcio a partir do material e o aumento induzido do pH, que foi inclusive realçado por uma mudança de cor no meio de cultura ⁽⁴⁶⁾. Um estudo recente, revela que o Biodentine™ mostrou ser mais citotóxico que o MTA numa cultura celular de fibroblastos humanos, o que poderia estar relacionado com a concentração de metais pesados libertados em água destilada. No caso do Biodentine™ foram encontradas concentrações mais elevadas de 5 metais pesados (arsénio, cobre, ferro, magnésio e zinco) comparativamente ao MTA ⁽⁵⁴⁾. Uma possível avaliação dos excipientes também seria interessante. O aumento da proliferação celular que se verifica posteriormente pode estar relacionada, essencialmente, com o próprio silicato tricálcico (que é um dos seus principais componentes) e também com a presença de iões cálcio e silício ^(38, 46).

Uma vez que não se encontra na literatura nenhum estudo semelhante (utilizando os mesmos materiais, linha celular, metodologia, tempo e ensaios realizados) será importante frisar novamente que os estudos existentes na literatura apresentam uma variabilidade subjacente entre si e que, para o mesmo(os) material(ais) podem-se obter resultados diferentes, de acordo com todas as condições experimentais e fatores referidos, bem como a própria variabilidade intrínseca do sistema biológico. Referir ainda que, em relação às diluições presentes neste estudo, pretendeu-se efetuar curvas dose-resposta. Sabemos que no tecido humano o

contingente celular é bastante superior àquele das placas de cultura. Além disso, o sistema vascular permite ativamente uma diluição dessas substâncias *in vivo*, o que não ocorre *in vitro*.

CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível retirar algumas conclusões:

A citotoxicidade dos materiais é dependente da diluição do meio condicionado (Life[®] e Biodentine[™]) e do tempo de exposição (Life[®], Biodentine[™] e White ProRoot[®] MTA).

A citotoxicidade do Life[®] aumentou com a concentração do meio condicionado e com o tempo de exposição, apresentando elevados padrões de solubilidade de componentes citotóxicos, tornando-o um material pouco recomendável para utilização em contacto direto com o tecido pulpar, nomeadamente em proteções pulpares diretas.

O White ProRoot[®] MTA mostrou ser o material mais biocompatível, apresentando baixos níveis de citotoxicidade mesmo em elevadas concentrações. Este material tende a aumentar a biocompatibilidade ao longo do tempo, aumentando a atividade metabólica e viabilidade celular da linha celular de fibroblastos humanos (HFF1). Deste modo, e tendo em conta as suas características, constitui um material recomendável para utilização em proteções pulpares diretas.

A citotoxicidade do Biodentine[™], ao contrário do White ProRoot[®] MTA, mostrou ser dependente da diluição do meio condicionado. Para concentrações mais elevadas, apresenta uma atividade metabólica e viabilidade celular diminuída, embora superior ao Life[®]. Verifica-se também que, de uma forma geral, a atividade metabólica e viabilidade celular tende a aumentar ao longo do tempo, apontando para a sua biocompatibilidade a longo prazo. Para além disso, apesar de se verificar uma tendência inicial para diminuição da atividade metabólica/viabilidade celular (que posteriormente aumenta), não se encontram diferenças significativas deste material com o White ProRoot[®] MTA para a diluição escolhida de 1/8. Desta forma, o Biodentine[™] poderá ser utilizado em proteções pulpares diretas tendo em conta a sua biocompatibilidade, propriedades físicas, facilidade de manuseamento e tempo de presa curto. No entanto, mais estudos a nível dos padrões de citotoxicidade deste material serão necessários para podermos categorizá-lo e utilizá-lo seguramente como uma alternativa viável ao White ProRoot[®] MTA.

AGRADECIMENTOS

À Mestre Anabela Paula agradeço todo o apoio, conselhos, disponibilidade e ensinamentos partilhados. Sem a sua orientação, motivação e preocupação nos momentos mais difíceis, a realização deste trabalho seria impossível. O meu sincero obrigada.

À Professora Doutora Eunice Carrilho, o meu grande agradecimento por me ter deixado fazer parte deste projeto. Obrigada pelo apoio, orientação, motivação e transmissão de conhecimentos ao longo de todo este ano.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço ter colocado à minha disposição todas as condições do seu instituto, bem como toda a sua experiência, sabedoria e dedicação. Obrigada por permitir a realização deste projeto. Obrigada por ser uma inspiração para todos nós.

À Mestre Mafalda Laranjo, a quem devo enorme gratidão. Obrigada por todas as orientações, conselhos e motivação. Obrigada pelo apoio nas situações mais difíceis, obrigada pela ajuda incondicional a levar este projeto a bom porto.

À Mestre Ana Margarida Abrantes agradeço o incentivo e boa disposição. Agradeço as palavras de conforto e todo o auxílio na realização deste trabalho.

Ao Mestre João Casalta agradeço sobretudo a sua prestabilidade, simpatia e boa disposição. Obrigada pelo apoio precioso na análise estatística dos resultados.

À Professora Doutora Anabela Sarmiento Ribeiro e à Mestre Ana Cristina Gonçalves um agradecimento pela disponibilidade e auxílio na obtenção dos resultados relativos à citometria de fluxo.

Agradeço ainda a todos os mestres que me ensinaram e partilharam comigo, ao longo destes cinco anos, os segredos da nossa profissão.

Aos meus amigos, aqueles que estiveram sempre lá e que me acompanharam nesta vida académica coimbrã, o meu muito obrigada. Obrigada pelo apoio, motivação, conforto e compreensão neste percurso. Obrigada por compreenderem as minhas ausências durante este ano letivo, por todos os momentos passados e ultrapassados. Obrigada por serem quem são.

À Ana, companheira de trabalho, companheira de vida. A ti agradeço todos os momentos que partilhámos. Sem ti não teria feito o mesmo sentido.

Aos meus familiares agradeço o incentivo, a amizade e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu irmão Bernardo pelo lugar que ocupa na minha vida e por todas as palavras amigas, o meu obrigada.

Ao Duarte, agradeço a força e coragem que me transmite, a ajuda e companheirismo. Agradeço a importância que tem na minha vida.

Aos meus pais, agradeço o apoio incondicional e valores transmitidos. Obrigada por compreenderem todo o meu esforço ao longo deste percurso. A vocês devo a pessoa que hoje me tornei, a vocês dedico este trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Orchardson R, Cadden SW. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. *Dent Update*. 2001;28(4):200-6, 8-9.
2. Huang FM, Li YC, Lee SS, Chang YC. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010;43(12):1091-7.
3. Okiji T, Yoshida K. Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent*. 2009;2009:464280.
4. B.K.B. B, G.R. H, B.J. M. Anatomia, embriologia e histologia bucal 2004.
5. Goldberg M, Lacerda-Pinheiro S, Jegat N, Six N, Septier D, Priam F, et al. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin North Am*. 2006;50(2):277-98, x.
6. Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem*. 2004;279(2):980-6.
7. Nie X, Tian W, Zhang Y, Chen X, Dong R, Jiang M, et al. Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture patterns. *Cell Biol Int*. 2006;30(4):295-300.
8. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997;25(5):355-72.
9. Pashley DH, Galloway SE, Stewart F. Effects of fibrinogen in vivo on dentine permeability in the dog. *Arch Oral Biol*. 1984;29(9):725-8.
10. Hahn CL, Overton B. The effects of immunoglobulins on the convective permeability of human dentine in vitro. *Arch Oral Biol*. 1997;42(12):835-43.
11. Byers MR, Närhi MV. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):4-39.
12. Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997;25(6):441-58.
13. Holland GR. Morphological features of dentine and pulp related to dentine sensitivity. *Arch Oral Biol*. 1994;39 Suppl:3S-11S.
14. Mjör IA, Svein OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int*. 2001;32(6):427-46.
15. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J*. 2007;52(1 Suppl):S4-16.
16. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*. 2000;28(2):77-92.
17. Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int*. 2002;33(2):151-9.
18. Briso AL, Rahal V, Mestrenner SR, Dezan Junior E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res*. 2006;20(3):219-25.
19. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod*. 2010;36(6):1042-7.
20. Cruvinel DR, Garcia LaF, Consani S, de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza F. Composites associated with pulp-protection material: color-stability analysis after accelerated artificial aging. *Eur J Dent*. 2010;4(1):6-11.
21. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod*. 2011;37(5):581-7.
22. Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin in human tooth pulp capped with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod*. 2011;37(12):1613-8.

23. Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J.* 2009;42(3):227-37.
24. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36(3):400-13.
25. Willershausen B, Willershausen I, Ross A, Velikonja S, Kasaj A, Blettner M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. *Quintessence Int.* 2011;42(2):165-71.
26. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(3):305-15; quiz -15.
27. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod.* 2005;31(5):387-91.
28. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod.* 2011;37(12):1691-5.
29. Witherspoon DE. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. *J Endod.* 2008;34(7 Suppl):S25-8.
30. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39(4):478-83.
31. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod.* 2009;35(4):475-80.
32. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J.* 2005;55(5):293-301.
33. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J.* 2013;46(1):3-19.
34. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):544-54.
35. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol.* 2012;28(1):25-32.
36. Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod.* 2010;36(11):1778-81.
37. Min KS, Yang SH, Kim EC. The combined effect of mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2009;35(6):847-51.
38. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39(6):743-7.
39. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010;36(1):16-27.
40. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21(4):297-303.
41. Darvell BW, Wu RC. "MTA"-an Hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction. *Dent Mater.* 2011;27(5):407-22.
42. Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang Y-H, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2009;107(5):739-44.
43. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010;36(2):190-202.
44. Accorinte ML, Loguercio AD, Reis A, Bauer JR, Grande RH, Murata SS, et al. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. *Int Endod J.* 2009;42(2):122-8.
45. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45(5):439-48.

46. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod.* 2012;38(9):1220-6.
47. Pérard M, Le Clerc J, Watrin T, Meary F, Pérez F, Tricot-Doleux S, et al. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(6):1527-34.
48. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2013;17(1):243-9.
49. Freshney R. Culture of animal cells - a manual of basic technique. In: Wiley, editor. Fifth ed.
50. Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir A, Tuna S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence Int.* 2009;40(8):e55-61.
51. Wadajkar AS, Ahn C, Nguyen KT, Zhu Q, Komabayashi T. In vitro cytotoxicity evaluation of four vital pulp therapy materials on I929 fibroblasts. *ISRN Dent.* 2014;2014:191068.
52. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod.* 2008;34(9):1057-60.
53. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, et al. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. *Int Endod J.* 2014.
54. Jang YE, Lee BN, Koh JT, Park YJ, Joo NE, Chang HS, et al. Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restor Dent Endod.* 2014;39(2):89-94.
55. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod.* 2012;38(3):385-8.
56. Wheeler MA, Falvo J, Ruiz F, Byars M. Chlorhexidine, ethanol, lipopolysaccharide and nicotine do not enhance the cytotoxicity of a calcium hydroxide pulp capping material. *Int Endod J.* 2012;45(11):989-95.
57. Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2004;30(1):25-9.
58. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent.* 2014;42(4):490-7.
59. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod.* 2014;40(3):406-11.