

Anabela Baptista Pereira Paula

ESTUDO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E NA DENTINOGÉNESE REPARADORA INDUZIDOS POR UM NOVO MATERIAL EM PROTEÇÕES PULPARES DIRETAS

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, orientada pela Professora Doutora Eunice Virgínia Valdez Faria Bidarra Palmeirão Carrilho, pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e Professor Doutor Manuel Marques Ferreira, e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Janeiro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Anabela Baptista Pereira Paula

**ESTUDO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E NA
DENTINOGÉNESE REPARADORA INDUZIDOS POR UM NOVO
MATERIAL EM PROTEÇÕES PULPARES DIRETAS**



CAPA

Imagem das células de rato tipo odontoblastos da linha MDPC-23 com coloração pelo meio *May-Grünwald Giemsa* obtida por microscopia ótica. Ampliação 500x.

Tese de Doutoramento do Programa de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Medicina Dentária, orientada pela Professora Doutora Eunice Virgínia Valdez Faria Bidarra Palmeirão Carrilho, pela Professora Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho e Professor Doutor Manuel Marques Ferreira, e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, financiada por bolsa GAI 2013, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (*Strategic Project* PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013) e COMPETE-FEDER.



A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta tese (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único).

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado:

- no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- no iCBR, *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research*, antigo Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida, IBILI; da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- no Instituto de Patologia Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra; e,
- na Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

PREFÁCIO

A terapêutica de proteção pulpar direta consiste na abordagem conservadora de uma exposição do tecido da polpa dentária ao ambiente externo. Sendo uma terapêutica minimamente invasiva os efeitos secundários são reduzidos e resulta na manutenção da vitalidade do órgão dentário. A etiologia desta situação clínica é diversa e vai desde a progressão da doença, cárie dentária, ao longo dos tecidos mineralizados até ao tecido pulpar, a traumatismos severos que envolvam perda de parte dos tecidos mineralizados do órgão dentário com exposição do tecido pulpar, até lesões iatrogénicas devido à manipulação dos tecidos dentinários com instrumentos manuais ou rotativos que atinjam os tecidos pulpares. Esta terapêutica é preconizada há várias décadas, devido à sua efetividade conceptual, isto é, a conservação de um tecido complexo vasculo-sensitivo, fundamental na fisiologia do órgão dentário; e à sua eficácia clínica, com biomateriais que conseguem, por um lado promover a cicatrização da lesão do tecido pulpar e, por outro, recuperar a integridade dos tecidos mineralizados adjacentes.

A complexidade da polpa dentária, quer seja anatomicamente, por estar confinada a um espaço rígido mineralizado relacionando-se com ele através de canalículos dentinários, quer seja fisiologicamente pelos diversos tipos de células existentes, pela monocamada de células que determinam o limite periférico do tecido e pelo complexo sistema vascular e nervoso, determina a utilização de um biomaterial com características muito particulares. Este deve ser biocompatível, antimicrobiano e estimulante do processo da dentinogénese reparadora, nomeadamente nas fases de diferenciação e de mineralização. Vários materiais já foram preconizados para serem utilizados neste tipo de abordagens terapêuticas e alguns

demonstraram ser desastrosos no cumprimento das características enumeradas, enquanto outros têm desempenhos clínicos favoráveis a longo prazo. Os cimentos à base de hidróxido de cálcio são os biomateriais com um maior *follow up* clínico, com resultados razoáveis, pelo que têm sido considerados o *gold standard*. Na década de 90 do século XX surgiram outros biomateriais, os cimentos à base de agregados trióxidos minerais, com desempenhos clínicos razoáveis, sendo atualmente considerados a terapêutica de eleição. No entanto, estes materiais têm alguns condicionalismos especialmente de manipulação, que dificultam a sua utilização clínica de rotina. Nessa perspetiva, tem havido uma tentativa para encontrar novos biomateriais para estas terapêuticas, nomeadamente os cimentos à base de silicatos tricálcicos.

O trabalho por nós desenvolvido vem aprofundar o conhecimento dos biomateriais que convencionalmente mais se utilizam nestas terapêuticas e permitiu avaliar as características e o comportamento não só dos referidos materiais mas ainda de um outro, mais recentemente proposto, o cimento de silicato tricálcico. Na presença de características reveladoras de um grande potencial terapêutico foi necessária a avaliação dos efeitos *in vitro* em células do tipo odontoblasto, uma vez que são as células com as quais os biomateriais contactam diretamente no órgão dentário. Foi necessário efetuar os estudos dos mecanismos subcelulares das terapêuticas com estes biomateriais. Como etapa sequencial aos estudos *in vitro* e perante os resultados promissores de uns e os resultados reveladores de citotoxicidade de outros, foram realizados estudos *in vivo* em modelo animal, essenciais para a avaliação pré-clínica. Após esta avaliação e de modo a comprovar a efetividade e a eficácia do novo biomaterial nas terapêuticas de proteção pulpar direta, foi elaborado um estudo clínico preliminar retrospectivo, dando forma à investigação translacional. De modo a coadjuvar o estudo clínico, foi elaborada uma revisão sistemática com meta-análise, dando robustez às conclusões e às implicações clínicas efetuadas. Assim, foi possível com este projeto identificar as características e os vários mecanismos de ação assim como as funções dos biomateriais, incrementando-se o conhecimento necessário para a formulação e a obtenção do biomaterial ideal, ou até, do seu desempenho clínico em terapêuticas de proteção pulpar direta.

Este trabalho abrangeu diversas áreas, desde as ciências fundamentais à investigação clínica, com envolvimento de um estudo animal, procurando-se realizar, como já referido, uma

investigação translacional sobre as terapêuticas de proteção pulpar direta. Um projeto de investigação que percorre todas estas fases só pode ser o resultado de um trabalho de uma equipa multidisciplinar, com contributos fundamentais de cada um dos elementos que a constituem, e que não podem deixar de ser enfatizados e enaltecidos.

Em primeiro lugar, como orientadora principal deste projeto, os mais sinceros agradecimentos à Professora Doutora Eunice Virgínia Palmeirão Carrilho, Professora Catedrática, Regente das Unidade de Clínica Integrada e da Valência de Pré-clínica 1 na área da Dentisteria Operatória do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Agradeço o papel fundamental inextinguível na orientação de todas as áreas deste projeto e de todo o meu percurso académico. Reitero o orgulho de ter recebido a sua confiança desde o início do meu percurso académico e clínico e dispor dos seus ensinamentos que marcaram e marcarão o meu olhar e a minha atitude sobre o exercício da Medicina Dentária em clínica e em investigação. O incentivo permanente, a confiança absoluta e a disponibilidade a todo o momento foram os motores que me ajudaram a concretizar este projeto e retenho-os como exemplo na minha postura na docência e na vida.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática, co-orientadora deste trabalho, Diretora do Serviço de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço o papel fundamental na orientação deste projeto desde a sua conceção à sua transformação física neste documento. A disponibilidade sem restrições do apoio logístico físico e intelectual para a concretização dos estudos *in vitro* e *in vivo*, e a visão ampliada e rigorosa que me proporcionou na investigação científica, foram determinantes na concretização deste estudo.

Ao Professor Doutor Manuel Marques Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação, co-orientador deste trabalho, Regente da Valência Clínica 1 na área da Endodontia do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço o contributo decisivo nos estudos *in vivo* em modelo animal, a disponibilidade total em todas as fases do projeto, o incentivo e o reconhecimento sempre verbalizado eloquentemente e os momentos de discussão científica que me proporcionaram uma visão ampliada dos resultados e das suas implicações clínicas.

À Doutora Mafalda Laranjo, uma amiga que adquiri neste percurso, agradeço toda a disponibilidade e apoio inextinguível em todas as fases deste projeto. O contributo intelectual imprescindível no desenvolvimento do mesmo, a transmissão do rigor científico e o gosto pela ciência vão certamente balizar a minha caminhada na investigação científica.

Ao Mestre Miguel Marto, um colega e amigo sempre presente neste percurso, agradeço a disponibilidade constante, o apoio incondicional a todo o momento, o contributo incomensurável no decorrer de todas as fases deste projeto e a partilha do gosto pela ciência e pela Medicina Dentária.

À Professora Doutora Ana Margarida Abrantes, agradeço o contributo decisivo nos estudos *in vivo* em modelo animal, o incentivo ao longo de todo o projeto, e a sua amizade e permanente boa disposição.

Ao Mestre João Casalta Lopes, agradeço pela ajuda na análise estatística e na interpretação dos resultados obtidos, pela sua amizade e incentivo.

Ao Professor Doutor Silvério Cabrita, Diretor do Instituto de Patologia Experimental, bem como aos seus colaboradores Mestre Eduardo Costa e Catarina Talina, pelo seu apoio no processamento das amostras histológicas, com contributo logístico físico e intelectual, os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e à Doutora Ana Cristina Gonçalves, agradeço o apoio nos estudos de citometria de fluxo, morfologia e PCR e pelo empenho e disponibilidade constantes.

Ao Mestre Bruno Fernandes, agradeço o seu contributo inextinguível e fundamental nos estudos de anatomia patológica, sempre com boa disposição e muita paciência.

À Doutora Ana Sofia Rodrigues agradeço o incentivo permanente e o apoio na interpretação de alguns resultados.

À Dr^a Helena Donato, agradeço o apoio na execução da revisão sistemática, especialmente na persecução da pesquisa bibliográfica.

À Doutora Siri Paulo agradeço a seu incentivo constante, a sua amizade e boa disposição.

À Mestre Ana Coelho agradeço pela partilha das mesmas dificuldades numa fase comum no percurso académico, e pela disponibilidade em colmatar as minhas ausências na atividade docente.

Às Mestres Cátia Sampaio e Inês Amaro pelo incentivo e disponibilidade permanentes.

Agradeço, ainda, a colaboração prestada na realização do trabalho experimental, à Doutora Salomé Pires e aos Mestres Ricardo Teixo, Gonçalo Brites, Beatriz Serembeque, Inês Marques, Rita Neves e reconhecimento na partilha de um ambiente de trabalho salutar, com incentivos diários e disponibilidade no trabalho laboratorial.

À minha família, João, Eduarda, Manuel, Maria de Lurdes, Maria Elisa e Luís António, agradeço a paciência ilimitada, o apoio incondicional, e o incentivo permanente em todos os desafios a que me proponho. Aos meus amigos agradeço o incentivo constante e solidariedade com a etapa a que me propus.

Pelo suporte financeiro individual agradeço a Bolsa atribuída pelo GAI 2013, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (*Strategic Project* PEst-C/SAU/UI3282/2013 e UID/NEU/04539/2013) e COMPETE-FEDER.

ÍNDICE

PREFÁCIO	ix
ÍNDICE.....	15
RESUMO	21
PARTE I – CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	31
CAPÍTULO I – TECIDOS DENTINÁRIOS E PULPARES.....	33
Dentina	36
Polpa dentária.....	43
CAPÍTULO II – DENTINOGENESE	53
Dentinogênese primária	57
Dentinogênese secundária ou fisiológica	59
Dentinogênese terciária ou reparativa.....	60
CAPÍTULO III – EXPOSIÇÃO PULPAR E TERAPÊUTICAS.....	69
Hidróxido de cálcio	75
Agregados trióxidos minerais.....	82
Silicatos tricálcicos	93
Outros materiais e ou terapêuticas	100
CAPÍTULO IV – OBJETIVOS.....	105
PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL.....	109

CAPÍTULO V – ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	111
Material e Métodos	114
Biomateriais	114
Culturas celulares	117
Estudos de citotoxicidade.....	119
Atividade metabólica	119
Viabilidade celular.....	120
Proliferação celular	121
Morte celular	122
Tipos de morte celular	122
Potencial de membrana mitocondrial	123
Ciclo celular	124
Stresse oxidativo	125
Morfologia celular	125
Diferenciação celular.....	126
Fosfatase alcalina - ensaio enzimático	127
Fosfatase alcalina - expressão génica.....	129
Mineralização	131
Sialoproteína de dentina	131
Depósitos de cálcio - morfologia.....	133
Depósitos de cálcio - quantificação	134
Análise estatística	135
Resultados.....	136
Meios condicionados	136

Estudos de citotoxicidade	137
Atividade metabólica	137
Viabilidade Celular	143
Morte celular	150
Proliferação celular	150
Vias de morte celular	151
Potencial de membrana mitocondrial	155
Ciclo celular	157
Stresse oxidativo	160
Morfologia celular	162
Diferenciação celular	163
Fosfatase alcalina – ensaio enzimático.....	163
Fosfatase alcalina - expressão génica.....	167
Mineralização	168
Sialoproteína da dentina	168
Depósitos de cálcio - morfologia.....	170
Depósitos de cálcio - quantificação	171
Discussão.....	173
CAPÍTULO VI – ESTUDOS <i>IN VIVO</i>.....	193
Material e Métodos	195
Desenvolvimento do modelo animal.....	196
Tratamento com biomaterial.....	197
Aquisição de imagem molecular por Medicina Nuclear	198
Análise histológica	200

Resultados.....	203
Estudo funcional	203
Terapêutica com biomaterial <i>in vivo</i>	204
Discussão.....	214
PARTE III – ESTUDO CLÍNICO	221
CAPÍTULO VII – REVISÃO SISTEMÁTICA.....	223
Material e Métodos	226
Pesquisa Bibliográfica	227
Extração de dados	228
Avaliação da qualidade dos estudos.....	228
Análise estatística para a meta-análise	229
Avaliação do risco de enviesamento dos estudos	230
Resultados.....	230
Seleção dos estudos	230
Características dos estudos	230
Avaliação da qualidade dos estudos.....	251
Meta-análise.....	257
Avaliação do risco de enviesamento dos estudos	264
Discussão.....	267
CAPÍTULO VIII – ESTUDO CLÍNICO	277
Material e Métodos	279
Seleção da amostra	279
Critérios de inclusão	280
Avaliação dos procedimentos clínicos das terapêuticas de proteção pulpar diretas	280

Avaliação dos casos clínicos após a terapêutica.....	281
Análise estatística	282
Resultados.....	282
Discussão.....	290
PARTE IV – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	299
PARTE V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	305
PARTE VI – SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS	338
PARTE VII – ANEXOS	344
ANEXO I – Materiais utilizados	346
ANEXO II – Aprovação da Orbea / DGVA	350
ANEXO III– Aprovação da Comissão de Ética	354

RESUMO

Algumas situações clínicas como cáries profundas, traumatismo severo da coroa dentária, e situações iatrogênicas podem levar a uma exposição do tecido pulpar ao ambiente oral externo. O tecido da polpa dentária tem um potencial natural de reparação, através de um processo designado de dentinogênese reparadora. Durante este processo, os odontoblastos danificados são substituídos por novas células diferenciadas do tipo odontoblasto. Este processo envolve a migração de células progenitoras para o local de lesão e posterior proliferação e diferenciação destas células em odontoblastos. Assim, quando há exposição do tecido da polpa dentária ao ambiente externo, a dentinogênese reparadora pode ser induzida pela realização de uma proteção pulpar, com o objetivo de manter a vitalidade e a função do tecido da polpa. Existe um consenso na comunidade científica de que o tratamento dessas condições requer o uso de materiais que induzam a reparação do tecido dentinário e, posteriormente, formem um tecido mineralizado entre o tecido pulpar e o material de reparação. Nesta técnica, o cimento de hidróxido de cálcio tem sido usado como terapia de eleição, com características físico-químicas importantes para o sucesso do tratamento. Desenvolvidos nos anos 90, os cimentos à base de agregados trióxido minerais receberam a maior atenção, inicialmente como um material de obturação retrógrada. As suas características permitiram a expansão das suas indicações como material para proteção direta da polpa. Embora existam evidências clínicas da utilização de cimentos à base de hidróxido de cálcio e de agregados trióxidos minerais nas terapêuticas de proteção pulpar direta com resultados satisfatórios, o melhor desempenho clínico de um em relação ao outro não é conclusivo. Recentemente surgiram os cimentos de silicato tricálcicos, como o Biodentine™. Este biomaterial possui uma base de hidróxido de cálcio e características semelhantes aos cimentos de agregados trióxidos minerais, mas com tempos de presa substancialmente mais adequados para a sua aplicação para além de outras vantagens clínicas.

Existem poucos estudos sobre esse material pelo que foi fundamental comparar seu comportamento com os outros biomateriais disponíveis.

O nosso projeto procurou determinar a bioatividade deste biomaterial na regeneração da dentina. Para alcançar esse objetivo foi necessária uma combinação de etapas, que se traduziram em diversos estudos. O estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar a viabilidade e a proliferação de células do tipo odontoblastos da linhagem celular MDPC-23 na presença de Biodentine™. Foram, também, efetuadas avaliações da diferenciação e da mineralização, por forma a verificar a eficácia deste material na dentinogênese reparadora. O estudo *in vivo* em modelo animal teve como objetivo avaliar o efeito do Biodentine™, incluindo a formação de dentina reparadora e as reações inflamatórias após a exposição do tecido pulpar, ao longo do tempo. O estudo clínico incluiu uma revisão sistemática com meta-análise com o objetivo de avaliar os fatores de sucesso após as terapêuticas de proteção ao tecido pulpar com cimentos à base de hidróxido de cálcio, de agregados trióxidos minerais e de silicatos tricálcicos. Além disso, foi efetuado um estudo clínico retrospectivo com 20 doentes onde se avaliou clinicamente a presença ou a ausência de sintomas compatíveis com a inflamação da polpa e radiograficamente as alterações radiculares e estruturais da restauração coronária que suporta a reparação do tecido pulpar.

Com os estudos *in vitro* foi possível concluir que o WhiteProRoot®MTA e o Biodentine™ têm resultados semelhantes, com manutenção da atividade metabólica e viabilidade celular, embora com uma ligeira redução para o segundo. Verificaram-se ligeiras alterações no ciclo celular, no potencial de membrana mitocondrial e na formação de peróxidos. O Life® mostrou uma diminuição da atividade metabólica e da viabilidade, com aumento da morte celular, perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento da formação de peróxidos e alterações no ciclo celular. A análise da morfologia celular demonstrou alterações profundas com o Life®, o que não se verificou com os outros biomateriais. A avaliação da diferenciação e da mineralização indicou um aumento acentuado na expressão de fosfatase alcalina, da sialoproteína da dentina e da formação de depósitos de cálcio com Biodentine™ quando comparado ao WhiteProRoot®MTA. O Life® não apresentou expressão das proteínas referidas e não revelou a formação de depósitos de cálcio.

Nos estudos *in vivo* em modelo animal foram efetuadas proteções pulpar diretas com os materiais de estudo em primeiros molares. As avaliações foram efetuadas em três tempos, aos 3, aos 7 e aos 21 dias e consistiram numa avaliação imagiológica (medicina nuclear) e histológica (coloração H&E, imunohistoquímica e *alizarin red S*). Com os estudos *in vivo* foi comprovado o efeito terapêutico dos biomateriais estudados. A avaliação através da medicina nuclear demonstrou que a captação de ^{99m}Tc -HMDP não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais e o controlo, revelando a não ocorrência de diferenças a nível do metabolismo fosfocálcio. O estudo histológico demonstrou diversas alterações como a presença de infiltrado inflamatório e a formação de tecido mineralizado ao longo dos diversos tempos de *follow-up*. Nos tratamentos com o WhiteProRoot[®]MTA verificou-se a presença de infiltrado inflamatório moderado após três dias, diminuindo ao longo dos outros tempos de *follow-up*. Apenas se verificou a formação de tecido mineralizado após 21 dias de *follow-up*. Nos tratamentos com o Biodentine[™] verificou-se a presença de um ligeiro infiltrado inflamatório ao terceiro dia, aumentando ao longo dos tempos de *follow-up*. A formação de tecido mineralizado foi observada a partir dos sete dias de *follow-up*, aumentando ao longo do tempo.

A revisão sistemática com meta-análise proporcionou uma avaliação clínica dos três biomateriais, concluindo-se que as terapêuticas com os cimentos à base de hidróxido de cálcio têm taxas de sucesso inferiores aos cimentos à base de trióxidos minerais, e que estes apresentam taxas de sucesso semelhantes aos cimentos de silicato tricálcico. Os outros materiais estudados revelam taxas de sucesso inferiores aos três biomateriais referidos no presente estudo. O estudo clínico revelou, de igual forma, taxas de sucesso semelhantes entre os cimentos à base de trióxidos minerais e os silicatos tricálcico.

Com este trabalho foi possível avaliar a bioatividade de um novo material de regeneração de dentina, Biodentine[™]. A sua baixa citotoxicidade e a sua capacidade indutora em diversos mecanismos da dentinogénese reparadora, o seu efeito terapêutico na formação de uma ponte dentinária acompanhada de ligeiros sinais inflamatórios e a sua elevada taxa de sucesso clínico, indicam a possibilidade da sua utilização efetiva e segura na proteção direta da polpa dentária em humanos.

Some clinical situations such as deep cavities, severe crown trauma, and iatrogenic situations may lead an exposure of the pulp tissue to the external oral environment. The tissue of the dental pulp has a natural potential for repair through a process called repair dentinogenesis. During this process, the damaged odontoblasts are replaced by new differentiated odontoblast cells. This process involves the migration of progenitor cells to the lesion site, and subsequent proliferation and differentiation of these cells into odontoblasts. Thus, when the dental pulp tissue is exposed to the external environment, reparative dentinogenesis can be induced by pulp capping, to maintain the vitality and function of the pulp tissue. There is a consensus in the scientific community that treating these conditions requires the use of materials that induce repair of the dentin tissue and subsequently form a mineralized tissue between the pulp tissue and repair material. In this technique, calcium hydroxide cement has been used as a gold standard, with important physico-chemical characteristics for the success of the treatment. Developed in the 1990s of XX century, mineral trioxide-based cements received large attention, initially as a retrograde filling material, and expanded its indications as a material for direct pulp capping. Although, there is clinical evidence of the use of calcium hydroxide-based cements and mineral trioxide aggregates in direct pulp capping therapies with satisfactory results, the best clinical performance in relation to each other is not conclusive. Recently, tricalcium silicate cements, such as Biodentine™, have emerged. This biomaterial has a calcium hydroxide base and characteristics like mineral aggregate trioxide cements but with tightening times substantially more suitable for their application and other clinical advantages. There are few studies on this material, and it was critical to compare their behavior with others.

This project aimed to determine the bioactivity of this biomaterial in dentin regeneration. To achieve this goal, a combination of steps was required, which resulted in several studies. The *in vitro* study aimed to evaluate the viability and proliferation of odontoblasts-like cells of the MDPC-23 cell line in the presence of Biodentine™. Differentiation and mineralization evaluations were also carried out to verify the efficacy of this material in reparative dentinogenesis. The *in vivo* animal model study aimed to evaluate the effect of Biodentine™, including repairing dentin formation and inflammatory reactions after pulp exposure and over time. The clinical study, included a systematic review with meta-analysis, aimed at assessing the success factors after pulp capping treatments with calcium hydroxide based cements, mineral trioxide aggregates and tricalcium silicates. In addition, a retrospective clinical study with 20 patients included a clinical evaluation of the presence or absence of symptoms compatible with pulp inflammation, and radiographic evaluation of the root and structural alterations of the coronary restoration that supports the repair of pulp tissue.

With *in vitro* studies it was possible to conclude that WhiteProRoot®MTA and Biodentine™ have related results, with maintenance of metabolic activity and cellular viability, although with a slight reduction to the second. There were slight changes in the cell cycle, mitochondrial membrane potential and peroxide production. Life® showed a decrease in metabolic activity and viability, with increased of cell death, loss of mitochondrial membrane potential, increased of peroxide formation and changes in the cell cycle. The analysis of cell morphology showed profound changes with Life®, which was not observed with the other biomaterials. The evaluation of differentiation and mineralization indicated a marked increase in the expression of alkaline phosphatase, dentin sialoprotein, and the formation of calcium deposits with Biodentine™ when compared to WhiteProRoot®MTA. Life® showed no expression of proteins and did not reveal a calcium deposits formation.

In the *in vivo* studies, direct pulp capping was performed with the study materials in the first molars. The evaluations were performed in three times, 3, 7 and 21 days, and consisted of an imaging (nuclear medicine) and histological evaluation (H&E staining, immunohistochemistry and alizarin red S). In *in vivo* studies the therapeutic effect of biomaterials was confirmed. Nuclear medicine evaluation demonstrated that the uptake of ^{99m}Tc-HMDP did not show

significant differences between the different experimental groups and the control, revealing the non-occurrence of differences in the phosphocalcium metabolism. The histological study demonstrated several alterations such as the presence of inflammatory infiltrate and the formation of mineralized tissue throughout the follow-up. With WhiteProRoot®MTA therapeutics, the presence of moderate inflammatory infiltrate was verified at 3 days, decreasing during the follow-ups. The formation of mineralized tissue was, only, verified at 21 days of follow-up. The therapeutics with Biodentine™, demonstrated the presence of a slight inflammatory infiltrate at the third day, increasing throughout the follow-up. The formation of mineralized tissue was observed from the 7-day follow-up, increasing over time.

The systematic review with meta-analysis provided a clinical evaluation of the three biomaterials, and it was concluded that calcium hydroxide cements have lower success rates than mineral trioxide cements, and that these have success rates like tricalcium silicate cements. The other materials showed lower success rates than the three biomaterials reported in the present study. The clinical study also revealed similar success rates between mineral trioxide cements and tricalcium silicates cements.

With this work it was possible to evaluate the bioactivity of a new dentin regeneration material, Biodentine™. Its low cytotoxicity and its inductive capacity in several mechanisms of reparative dentinogenesis, its therapeutic effect on the formation of a dentin bridge accompanied by slight inflammatory signs, and its high clinical success rate, indicate the possibility of its effective and safe use in the direct capping of the dental pulp in humans.

PARTE I – CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

CAPÍTULO I – TECIDOS DENTINÁRIOS E PULPARES

O órgão dentário é composto por três tecidos mineralizados, o esmalte, a dentina e o cimento que envolvem um tecido conjuntivo laxo, a polpa dentária. Em termos embrionários, o esmalte é de origem ectodérmica enquanto a dentina, o cimento e a polpa dentária são de origem ectomesenquimatosa. O esmalte é um tecido quase completamente mineralizado, composto por hidroxiapatite (88 a 90%), água (5 a 10%) e matriz orgânica (1 a 2%), que cobre a totalidade da coroa dentária. A dentina é o tecido estrutural da maior parte do órgão dentário, e encontra-se coberta por esmalte na sua porção coronária e por cimento na sua porção radicular. A polpa dentária tem origem na papila dentária e, enquanto estrutura viável, é responsável pela formação da dentina. Também atua como órgão sensitivo, pois é capaz de responder a estímulos e detetar toxinas que afetam a dentina. O órgão dentário está suportado por vários tecidos que, coletivamente, se designam por periodonto. Este inclui o osso alveolar, que forma o alvéolo dentário, o ligamento periodontal, tecido conjuntivo que une o dente ao osso alveolar e a gengiva que recobre estas estruturas em redor do órgão dentário (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003, 2003).

Dos tecidos que fazem parte da coroa do órgão dentário, o esmalte é aquele que cobre a totalidade da coroa do dente. É mais espesso nas extremidades das cúspides e nos bordos incisais, enquanto na coroa dentária apresenta menor espessura, a qual se torna muito fina na zona cervical. É um tecido altamente mineralizado, constituído por cerca de 90% de componente mineral, com o restante a ser constituído por água e conteúdo orgânico. A parte orgânica direciona o crescimento da componente mineralizada, que é composta principalmente por cristais de hidroxiapatite. Este conteúdo mineral aumenta desde a junção amelodentinária até à superfície, com formação de um tecido mais duro superficialmente. A água corresponde a 5 a 10% da massa do esmalte, está presente em todo o tecido e é responsável pela porosidade. A

percentagem de matriz orgânica varia de 1% a 2%, e é composta por proteínas como as amelogeninas, as enamelinas e outras pequenas moléculas como peptídeos e aminoácidos livres. Este componente não tem distribuição homogênea e encontra-se, em maior quantidade, na zona da junção amelodentinária. A unidade morfológica do esmalte é o prisma de esmalte, constituído por milhões de cristais de hidroxiapatite. As margens dos prismas mostram mudanças bruscas na organização dos cristais, com efeitos óticos diversos. A junção amelodentinária tem, também, diferentes padrões óticos do tipo festonado com convexidades do lado do esmalte e concavidades do lado da dentina. Os cristais da dentina são muito menores do que os do esmalte e a transição de um tecido para outro é geralmente visível. Grupos de estruturas como fusos, tubos e lamelas, podem ser vistos na junção amelodentinária e estendem-se da superfície da dentina para dentro do esmalte (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003).

Existem outros dois tecidos que constituem a maior parte do órgão do esmalte, e que fazem parte da coroa dentária e estrutura radicular, que são a dentina e a polpa dentária. Estes serão descritos mais detalhadamente abaixo, por serem tecidos que desempenham um papel fundamental na dentinogênese primária, secundária e reparadora.

Dentina

A dentina é um tecido produzido por odontoblastos que se desenvolvem a partir de células ectomesenquimatosas da papila dentária em contato com a lâmina basal formada pelo epitélio de esmalte (Garant, 2003). Este tecido rígido, mineralizado, que forma a maior parte da estrutura dentária é estruturalmente constituído por inúmeros túbulos dentinários suportados por uma matriz de colagénio mineralizada. Estes túbulos dentinários contêm no seu interior prolongamentos das células produtoras de dentina, os chamados processos odontoblásticos, assim como fluido extracelular. Os corpos celulares dos odontoblastos estão organizados na superfície mais profunda da dentina, e constituem a zona de transição para o tecido pulpar (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003; Goldberg *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012).

A dentina é composta, aproximadamente, por 70% da massa seca de conteúdo mineral inorgânico, 20% de massa seca de matriz orgânica e 10% de massa de água. O conteúdo mineral inorgânico aparece sob a forma de cristais de hidroxiapatite, é rico em cálcio e em fósforo, e distribui-se entre as fibras de colagénio. A matriz orgânica da dentina é constituída por fibras de colagénio (90% da massa) distribuídas pela substância fundamental amorfa. As principais são de colagénio do tipo I, embora também possam existir fibras de colagénio do tipo III e do tipo V. A maioria das fibras de colagénio organiza-se paralelamente à superfície pulpar, mas não se agrupam em feixes. Existem, ainda, outras proteínas na matriz, nomeadamente fosfoproteínas, proteoglicanos, proteínas Gla, outras proteínas ácidas assim como fatores de crescimento (About *et al.*, 2000; Embery *et al.*, 2001). As fosfoproteínas, como a fosfoproteína da dentina (do inglês *dentin phosphoprotein* - DPP), a proteína da matriz dentinária I (do inglês *dentin matrix protein 1* - DMP1) e a sialoproteína da dentina (do inglês *dentin sialoprotein* - DSP), são as principais proteínas não colagénicas (Butler, 1995; Yamamoto, Oida e Yamakoshi, 2015). São fosforiladas, com grande afinidade para a ligação com iões cálcio, pelo que cumprem um papel fundamental nos processos de mineralização. Os proteoglicanos estão representados por várias classes especialmente, as biglicanas (condroitina) e a decorina, que têm como principal função a reunião de fibras de colagénio e a mediação na adesão, a migração, a proliferação e a diferenciação celulares (Butler e Ritchie, 1995; Magloire, Bouvier e Joffre, 1992). As proteínas Gla, ou proteínas que contêm carboxilglutamato, estão ligadas aos cristais de hidroxiapatite e desempenham funções na mineralização. De entre as proteínas ácidas, podemos referir a osteonectina e a osteopontina. A osteonectina representa 5% do total das proteínas da dentina e contém níveis elevados de ácido glutâmico e de ácido aspártico. A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada presente na pré-dentina que contém a sequência de *sites* de ligação para a Arg-Gly-Asp (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003). Os lípidos correspondem acerca de 2% do conteúdo orgânico da dentina e estão mais concentrados nas zonas de mineralização. Alguns fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês *bone morphogenetic proteins* - BMP) e o fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *transforming growth factor beta* - TGF- β), têm sido isolados na matriz dentinária não mineralizada. Estes fatores de crescimento podem ter um papel importante na diferenciação

dos odontoblastos durante a formação de dentina reparadora (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003; Goldberg, 2014; Goldberg *et al.*, 2011).

A dentina é preenchida por túbulos dentinários que se situam entre a superfície pulpar e as junções amelodentinárias e cementodentinárias. O diâmetro dos túbulos varia de 2,5 μm na zona periférica onde existem cerca de 20.000/mm², a 1 μm na zona pulpar onde se estima existirem cerca de 50.000/mm². Os túbulos dentinários ramificam-se, especialmente na periferia junto à junção amelodentinária, mas muitas destas ramificações podem-se unir. A parede dos túbulos é formada pela dentina peritubular, cuja deposição diminui o diâmetro dos mesmos ao longo do desenvolvimento. Entre os túbulos encontra-se a dentina intertubular, rica em colagénio do tipo I. Estes dois tipos de dentina diferem pela existência de matriz fibrosa de colagénio, a qual está presente apenas na dentina intertubular. Na dentina intertubular, formam-se cristaltos minerais tipo placa, com 2 a 5 nm de espessura e 60 nm de comprimento, e a sua magnetização dá-lhes a aparência semelhante a uma agulha (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003; Goldberg *et al.*, 2011; Sasaki e Garant, 1996). Estão localizados na superfície das fibras de colagénio e são paralelos ao eixo dessas mesmas fibras. A desmineralização da dentina intertubular revela uma rede densa de fibras de colagénio, revestidas por proteínas não colagénicas (Garant, 2003; Goldberg *et al.*, 2011; Mjör, Sveen e Heyeraas, 2001). Por outro lado, a dentina peritubular é cerca de 15% mais mineralizada do que a intertubular, sendo o principal componente a apatite carbonada. O componente mais importante do conteúdo proteico é uma proteína de alto peso molecular, com uma composição de aminoácidos razoavelmente diferente da fosforina, encontrada na dentina intertubular. Na dentina peritubular são, também, observadas estruturas isodiamétricas de cerca de 25 nm de diâmetro, formando um anel em torno do lúmen dos túbulos. Após desmineralização suave, não são detetadas fibras de colagénio, mas antes uma fina rede de proteínas não colágenicas e de fosfolípidos (Arana-Chavez e Massa, 2004; Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Goldberg e Septier, 2002).

Associado ao envelhecimento fisiológico, especialmente na dentina radicular, os túbulos dentinários tornam-se completamente obliterados pela deposição de dentina peritubular. Os túbulos dentinários contêm, no seu interior, o processo odontoblástico, que é responsável pela

sua formação. Além deste componente principal podem encontrar-se, em alguns e em parte do seu comprimento, terminações nervosas aferentes e processos das células apresentadoras de antígeno do tecido pulpar. O processo odontoblástico não ocupa a totalidade do comprimento do túbulo dentinário onde se encontra, sendo o restante designado por espaço pós-odontoblástico e preenchido por fluido dentinário. A composição deste fluido não é totalmente conhecida, devido às dificuldades técnicas de processamento das amostras, mas parece ter uma alta concentração de íons potássio e uma baixa de íons sódio. Estas proporções iônicas fazem com que, após uma rutura da integridade do túbulo, se gere uma pressão osmótica para o exterior do tecido pulpar impedindo a progressão de substâncias químicas e de toxinas para o interior do mesmo. O processo odontoblástico que se estende ao longo da dentina varia estruturalmente, sendo os organelos mais numerosas na pré-dentina, enquanto na dentina mineralizada poucos estão presentes. Os microtúbulos e os filamentos intermédios correm longitudinalmente ao longo de todo o processo odontoblástico como processo celular que é, sendo formados por actina, tubulina e vimentina; as mitocôndrias estão presentes na pré-dentina, e segmentos de retículo endoplasmático rugoso aparecem ocasionalmente (Garant, 2003; Goldberg *et al.*, 2011; Linde e Goldberg, 1993; Linde e Lundgren, 1995; Sasaki e Garant, 1996). Aquando da descrição do tecido pulpar, a descrição da célula odontoblástica far-se-á detalhadamente.

A dentina está organizada em várias regiões decorrentes das diferentes características da estrutura dentária e dos diferentes tempos de formação como demonstra a Figura 1.

A camada mais interna, a pré-dentina, não é mineralizada e é onde se vai depositando dentina ao longo da vida, quer seja por estímulos fisiológicos quer por estímulos patológicos. A pré-dentina é a zona de matriz dentinária depositada inicialmente pelo processo odontoblástico, sem que tenha ainda ocorrido mineralização. A espessura desta camada pode variar entre 10 os 40 μm , na dependência da taxa de deposição sendo, contudo, mais espessa em dentes jovens. A zona imediatamente periférica à pré-dentina é designada por dentina intermediária, onde já se encontra alguma deposição mineral. A grande parte de dentina, estrutura básica deste tecido, é a dentina circumpulpar.

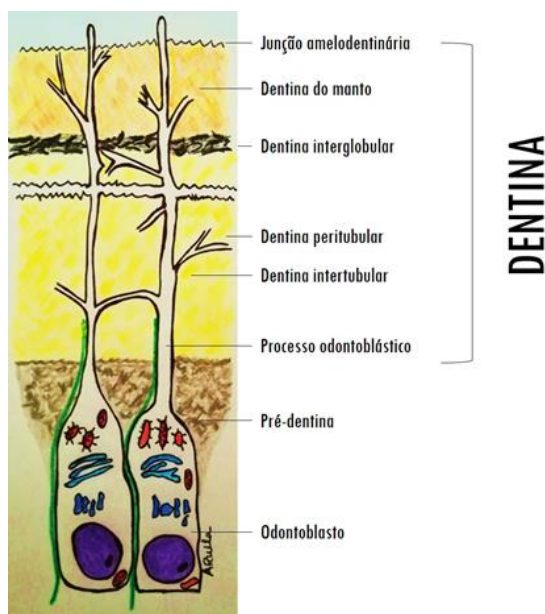


Figura 1: Desenho esquemático da formação das diferentes camadas de dentina. Célula odontoblástica diferenciada, com núcleo na região basal, e outros organelos no citoplasma (mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e várias vesículas); e com processo odontoblástico no interior da camada de dentina. Junto ao corpo principal da célula odontoblástica encontra-se a camada de pré-dentina. A dentina é constituída por diferentes camadas, que se formam e depositam no sentido da junção amelo-dentinária até à camada odontoblástica: dentina do manto, dentina interglobular e a camada com maior espessa que tem dois tipos de dentina (dentina intertubular, entre os túbulos dentinários; e dentina peritubular, que forma a parede dos túbulos dentinários). As terminações nervosas (verde), com origem no tecido pulpar, prolongam-se pelo interior do túbulo dentinário. Desenho de autor.

Esta camada é uniforme quanto à sua estrutura, organizada com um padrão tubular (About *et al.*, 2000). Nos estádios iniciais da dentinogênese a dentina é fina, mas a sua espessura aumenta continuamente (cerca de $4\mu\text{m}/\text{dia}$) à custa do espaço inicialmente ocupado pelo tecido pulpar. Esta camada tem uma parte mais proeminente que é formada por dentina intertubular, enquanto a dentina peritubular é encontrada à volta do lúmen dos túbulos. A formação concomitante de dentina inter e peritubular resulta de dois tipos diferentes de mineralização. A dentina intertubular resulta das modificações que ocorrem entre a pré-dentina não mineralizada e a dentina localizada imediatamente atrás da frente de mineralização, uma fronteira designada por metadentina. A maioria das proteínas fosforiladas são segregadas na metadentina, perto da frente de mineralização. Por outro lado, a formação de dentina intertubular fornece um modelo único de três camadas sucessivas. A primeira camada, localizada na periferia da polpa, corresponde ao estrato celular e é constituída pelos corpos celulares dos odontoblastos e das

células de Höehl. A segunda camada, a camada de pré-dentina imatura, tem uma espessura que varia de 15 a 20 μm . A terceira camada, a camada de dentina mineralizada, localiza-se desde a frente de mineralização até à junção dentina-esmalte do manto (Goldberg *et al.*, 2011; Linde e Lundgren, 1995; Ruch, 1998). A dentina peritubular não resulta da transformação da pré-dentina em dentina, mas da adsorção ao longo do lúmen dos túbulos de uma matriz amorfa, podendo ser segregada pelos processos odontoblásticos dentro da dentina ou resultante da linfa dentinária. Proteoglicanos, lípidos e outras proteínas do complexo do retículo endoplasmático (do inglês *endoplasmic reticulum membrane protein complex* - ECM) estão implicados na formação de uma fina rede amorfa, dando origem a uma dentina peritubular hipermineralizada densa (Goldberg *et al.*, 2011). A parte mais externa da dentina circumpulpar, designada por dentina interglobular, é incompletamente mineralizada. Como esta zona não é totalmente mineralizada, as áreas dos túbulos dentinários não apresentam dentina peritubular. A camada mais externa, e por isso mais precocemente formada é, na zona da coroa dentária, designada de manto de dentina e que na zona radicular é formada por duas partes morfológicamente distintas, a camada granular de Tomes e a camada de hialina. O manto de dentina varia em espessura de 20 a 150 μm e tem uma estrutura tridimensional festonada com a interligação e interpenetração das inúmeras ramificações dos túbulos dentinários com os prismas de esmalte. É ligeiramente menos mineralizada do que a dentina circumpulpar e as suas fibras de colagénio estão orientadas perpendicularmente à junção amelodentinária. A camada granular é hipomineralizada quando comparada com a camada circumpulpar, devido à presença de inúmeras ramificações tubulares. A camada de hialina tem cerca de 20 μm de espessura, com uma estrutura não tubular e relativamente desestruturada, onde se liga a camada de cimento (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Garant, 2003; Goldberg *et al.*, 2011; Orchardson e Cadden, 2001).

Tal como já foi referido atrás, a dentina pode sofrer modificações ao longo do tempo. Se estas alterações forem de origem fisiológica, isto é, relacionadas com a idade, o tecido dentinário depositado é designado por dentina secundária e dentina esclerótica. Se tiverem origem patológica como a cárie ou a atrição, é considerada dentina terciária, reacional ou reparadora. Assim, durante a odontogénese, os odontoblastos são fundamentais para a

formação da dentina primária até que o dente se torne funcional. Quando os contatos entre cúspides antagonistas são estabelecidos, a formação de dentina secundária começa imediatamente e continua ao longo da vida. Inicialmente, os odontoblastos produzem constantemente moléculas da matriz conduzindo à formação de uma camada de 10 μm de espessura, que posteriormente se reduz, mas com um depósito diário de 4 μm . No entanto, não há muita diferença entre a dentina primária e a secundária. A única e grande diferença é morfológica, a curva S dos túbulos é mais acentuada na dentina secundária, devido à restrição espacial gradual dos odontoblastos, localizada na periferia e tornando-se o padrão tubular menos regular à medida que se deposita a dentina secundária (Goldberg *et al.*, 2011; Orchardson e Cadden, 2001).

A dentina esclerótica surge como resposta fisiológica ao envelhecimento ou como resposta a um estímulo interno devido a atrição severa ou a cárie de progressão muito lenta. Esta dentina é caracterizada por um preenchimento dos túbulos dentinários por um material cristalino, a apatite ou fosfato de octacálcio, com ausência total de processo odontoblástico (Bleicher, 2014; Goldberg, 2014; Goldberg *et al.*, 2011; Larmas e Sándor, 2014).

A dentina terciária, reparadora ou reacional é um tecido duro depositado na superfície pulpar em resposta a um estímulo externo. Estes estímulos podem ser cárie dentária, atrição, preparação cavitária, microinfiltração de resinas ou traumatismos. Esta dentina caracteriza-se por não ter um padrão de apresentação, isto é, pode revelar-se atubular ou com uma estrutura tubular regular, uma vez que pode ocorrer em diferentes estádios de desenvolvimento ou de envelhecimento. Esta dentina apresenta-se como uma camada do tipo osteodentina ou ortodentina tubular ou atubular, na dependência da velocidade e da gravidade da lesão/traumatismo, da progressão da reação e da idade do doente (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Goldberg *et al.*, 2011). A produção desta matriz pode ser efetuada por duas vias. Pelos odontoblastos preexistentes, quando não são lesados ou por células mesenquimatosas, tipo odontoblastos, que se encontram quiescentes. Estas células são estimuladas a diferenciar-se, quando os odontoblastos preexistentes são lesados, por diversos fatores sintetizados localmente e libertados durante o processo inflamatório (Murray *et al.*, 2003), como se descreve a diante.

Polpa dentária

A polpa dentária está localizada dentro da câmara pulpar e do sistema de canais radiculares, sendo contínua com o ligamento periodontal, na região apical. Uma das suas principais funções é a formação da dentina. Embora tenha um contributo significativo no desenvolvimento e na erupção do órgão dentário, ela permanece ativa durante toda a vida, à medida que a dentina secundária é formada. É capaz de responder a estímulos aplicados, tais como processos cariosos, traumáticos ou procedimentos restauradores, com produção de dentina terciária (Trowbrigde, Kim e Suda, 2001). A polpa dentária é um tecido conjuntivo especializado, com uma estrutura anatómica tridimensional específica, determinada pela sua posição dentro de uma câmara rígida e pelo seu papel formador de tecido duro dentinário sobre as paredes dessa mesma câmara (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Goldberg, 2014; Pashley, 1996). As células diretamente responsáveis pela deposição/aposição de dentina, os odontoblastos, estão localizados na periferia do tecido. Na região supra-odontoblástica, zona entre esta camada de odontoblastos e a pré-dentina, existem dois elementos capazes de detetar estímulos externos, as terminações nervosas aferentes do trigémio, que forma o plexo de *Bradlaw*, e as células apresentadoras de antígenos, iniciando e participando, pelo menos em parte, na resposta. Assim, a camada de odontoblastos constitui o primeiro nível de deteção pela polpa dos estímulos externos (Allard *et al.*, 2006; Pashley, 1996). O restante tecido da polpa atua como sistema de suporte a estes elementos celulares fundamentais. Imediatamente abaixo da camada de odontoblastos aparece uma camada acelular ou de *Weil*, seguida de uma zona rica em células com uma grande quantidade de capilares e de fibras nervosas, o denominado plexo capilar e neural subodontoblástico. O sistema de vasos sanguíneos e de feixes nervosos, suportados num tecido conjuntivo laxo, penetra e abandona os canais radiculares por uma estrutura na extremidade da raiz designada *foreman* apical (Trowbrigde, Kim e Suda, 2001). Estas estruturas por onde o órgão dentário é vascularizado e inervado podem estar presentes num variado número com pequenos canais acessórios e respetivos foramina apicais (Andreasen, 2012; Goldberg, 2014). A variabilidade anatómica permite ainda estruturas dentárias com várias raízes e canais acessórios a nível apical ou a nível da furca, no caso de dentes multirradiculares.

O tecido pulpar é um tecido conjuntivo laxo formado por uma variedade de células dispostas numa matriz extracelular de fibras. É constituído por água em cerca de 75% da sua massa e 25% de material orgânico. À semelhança da maioria dos tecidos conjuntivos, a matriz existe em maior quantidade do que as células. A matriz extracelular é constituída por um conjunto versátil de polissacáridos e proteínas secretadas pelas células do tecido e aglomeradas numa complexa teia associada às células. Esta matriz forma uma estrutura densa que estabiliza o tecido, que não é inerte, e que tem uma função esquelética mínima. A matriz desempenha um papel ativo no controlo da atividade celular, afetando o seu desenvolvimento, a migração, a divisão, a forma e a função (Trowbridge, Kim e Suda, 2001). O colagénio é o componente predominante da matriz extracelular e corresponde a cerca de 25 a 32% da sua massa seca. A composição da papila dentária e da polpa dentária variam com o desenvolvimento do órgão dentário ao longo do tempo, podendo mesmo variar de dente para dente (Andreasen, 2012; Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Goldberg, 2014; Pashley, 1996).

O principal componente fibroso da polpa dentária é, como já referido, o colagénio do tipo I, colagénio característico do osso, do cimento, da pele, do tendão e da dentina. O colagénio está presente sob a forma de fibras distribuídas através do tecido pulpar, com cerca de 50 nm de diâmetro e muitos micrómetros de comprimento, que se reúnem em feixes de diferentes espessuras. A sua disposição na estrutura pulpar é irregular, com exceção da periferia onde se tornam alinhadas e paralelas à superfície da pré-dentina em formação. Durante os estádios iniciais do desenvolvimento, alguns feixes organizam-se em ângulo reto relativamente à dentina em desenvolvimento, contribuindo para o aspeto das fibras de *Von Korff* na dentina externa. Existe, também, uma grande quantidade de colagénio do tipo III que, embora tenha um padrão de estriação semelhante ao colagénio do tipo I, difere deste. O colagénio do tipo I tem cadeias moleculares $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e o colagénio do tipo III contém somente cadeias do tipo $\alpha 1$. Cerca de 56% da massa do colagénio pulpar é do tipo I e 41% do tipo III. O significado funcional destas elevadas percentagens de colagénio do tipo III é desconhecido, porém sabe-se que noutras regiões está associado a uma remodelação e controlo do diâmetro das fibras, mais eficaz. Para além destes dois tipos de colagénio, encontram-se ainda presentes colagénio do tipo V e do tipo VI (Hillmann e Geurtsen, 1997; Lukinmaa e Waltimo, 1992). Ao todo, o colagénio forma cerca de

3 a 5% da massa húmida da polpa, valor menor quando comparado com outros tecidos conjuntivos. Microfibras de diâmetro mais reduzido que o colagénio, têm sido, também, detetadas. Estas são constituídas uma glicoproteína grande que forma fibrilhas em grupos de 10 a 14 nm de diâmetro. Noutros tecidos estas estão associadas com fibras elásticas, mas que estão ausentes no tecido pulpar (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Goldberg, 2014; Pashley, 1996).

O componente não fibroso da matriz extracelular é constituído por macromoléculas que podem ser classificadas em glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras moléculas de adesão. Os glicosaminoglicanos (GAGs) são cadeias de polissacáridos compostas por unidades de dissacáridos que se repetem, as quais, quando ligadas covalentemente a proteínas, formam glicoproteínas. Os GAGs presentes no tecido pulpar são os que aparecem mais comumente no tecido conjuntivo laxo, e são eles o sulfato de condroitina, o dermatano, o heparano sulfato e o hialurano. Os GAGs são moléculas volumosas e hidrofílicas que facilmente formam géis e preenchem o espaço extracelular. Quando hidratadas, estas moléculas aumentam de volume, podendo contribuir para a elevada pressão do fluido tecidual pulpar. Este facto fornece suporte mecânico, mas também permite uma circulação facilitada das moléculas solúveis em água e nas células. O hialurano é o único que não está ligado a proteínas mas, para além de uma função mecânica, desempenha um papel importante na migração celular, sendo então prevalente no desenvolvimento. Numa polpa dentária em desenvolvimento o sulfato de condroitina é o principal GAG, com o hialurano menos frequente. Por outro lado, no tecido pulpar maturo o GAG predominante e que representa 60% da massa é o hialurano, enquanto cerca de 20% da massa corresponde a dermatano sulfato e 12% da massa a sulfato de condroitina (Pashley, 1996). Os proteoglicanos são constituídos por uma porção central de proteínas de diferentes massas moleculares, circundada por GAGs e outros açúcares. Já alguns foram identificadas na polpa dentária, associados a diversas funções como: a decorina (ligação ao colagénio do tipo I), a biglicana (efeito regulador na fibrogénese do colagénio), o versican (participação em grandes agregados de proteoglicanos), o sindecan (ligação da superfície celular a colagénio fibroso e outras proteínas da matriz) e a tenascina (promoção ou inibição da adesão celular) (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Embery *et al.*, 2001; Goldberg, 2014). A fibronectina é uma

glicoproteína da família das integrinas, amplamente distribuída no tecido pulpar, e tem como função a adesão celular, quer seja pela ligação das células à matriz extracelular quer seja por ligação ao citoesqueleto, a regulação da morfologia celular, a migração e a diferenciação. A laminina pertence à mesma família e está presente nas membranas basais das células endoteliais dos vasos sanguíneos e das células de *Schwann*. Tem como principal função a ligação das células epiteliais à matriz extracelular e a ligação de algumas moléculas de sinalização. Também estão presentes nos odontoblastos, quer nos seus corpos celulares quer nos processos odontoblásticos, embora estes, mesmo estando organizados em monocamada, não possuem membrana basal (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Goldberg, 2014; Hillmann e Geurtsen, 1997; Lukinmaa e Waltimo, 1992).

As células presentes no tecido pulpar são diversas, nomeadamente odontoblastos, fibroblastos, células de defesa como macrófagos e células apresentadoras de antígenos e outras células indiferenciadas. Os odontoblastos são responsáveis pela formação de dentina. A formação e a diferenciação destas células será abordada mais adiante num capítulo próprio. Num dente maturo, os odontoblastos continuam a produzir dentina secundária durante toda a vida e sobrevivem enquanto o dente permanecer com vitalidade. Se o dente sofrer um traumatismo contínuo pelo aparecimento, por exemplo, de uma cárie, a deposição de dentina secundária pode ser acelerada, mas com produção limitada. Os odontoblastos sendo células pós-mitóticas, não se dividem e, conseqüentemente, quando sujeitos a um traumatismo severo ocorre morte celular. No entanto, as células subodontoblásticas, nestas circunstâncias, podem-se dividir, diferenciar e criar uma barreira protetora de dentina terciária (Hillmann e Geurtsen, 1997; Murray *et al.*, 2003; Sasaki e Garant, 1996). O odontoblasto completamente diferenciado, como se descreve na Figura 2, é uma célula colunar polarizada com um processo celular único e longo, que se estende dentro da pré-dentina e do túbulo dentinário. Este processo citoplasmático está na zona distal do corpo celular e contém diversos microtúbulos longitudinais, filamentos citoplasmáticos e vesículas endo e exocíticas. O corpo celular tem aproximadamente 50 µm de comprimento e 5 a 10 µm de largura. O núcleo está na metade basal (pulpar) da célula em conjunto com outros organelos envolvidos na síntese de dentina, nomeadamente o retículo endoplasmático rugoso, o aparelho de Golgi, as mitocôndrias, os grânulos de secreção

específicos, os corpos densos do tipo lisossomal, os centríolos e as estruturas ciliares proeminentes. Além do processo odontoblástico principal, existem numerosos processos menores que ligam um odontoblasto a outros adjacentes e a outras células pulpares (Bleicher, 2014; Cooper *et al.*, 2010; Sasaki e Garant, 1996; Unda *et al.*, 2000).

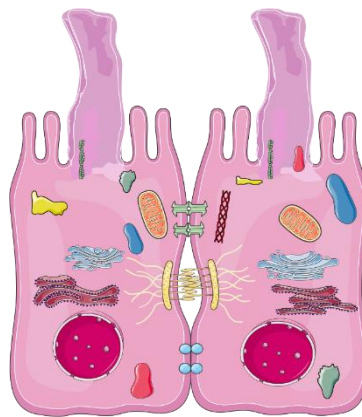


Figura 2: Célula odontoblástica de um dente maduro (aparência típica de baixa atividade celular) com vários organelos celulares (mitocôndria, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático rugoso) na região supranuclear. O núcleo situa-se na parte basal da célula. O processo odontoblástico principal está situado na zona apical da célula. As células odontoblásticas estão dispostas em monocamada e mantêm ligações intercelulares do tipo desmossoma (amarelo), *tight junctions* (azul) e *gap junctions* (verde). Também se observam algumas vesículas e componentes do citoesqueleto. Esquema adaptado de (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004) e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

No dente maduro, os odontoblastos formam uma camada única de células ligadas à superfície da pré-dentina por um único processo celular que se estende dentro dos túbulos dentinários (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Murray *et al.*, 2003; Sasaki e Garant, 1996). Os odontoblastos presentes na zona coronária são colunares, enquanto que os que estão na zona radicular têm a forma cuboide. Esta camada de odontoblastos permite criar uma barreira de controle entre a polpa e a dentina, especialmente contra os agentes irritantes externos. A difusão de moléculas da dentina para a polpa é dificultada pelo fluxo de fluido dentinário que se faz no sentido oposto, do tecido pulpar para a dentina. Estas agressões externas quando intensas, provocam dor devido ao movimento do fluido dentinário dentro dos túbulos

dentinários criando, conseqüentemente, diferenças de pressão dentro da polpa (Bleicher, 2014). A integridade desta camada de odontoblastos e a sua capacidade de se comportar como barreira é mantida por numerosas junções celulares, nomeadamente a junção do tipo mácula (desmossoma), a junção oclusiva (do inglês *tight junction*) e a junção comunicante (do inglês *gap junction*). A junção do tipo mácula tem um componente intercelular e um sistema intracelular de fibrilhas de ancoragem que é responsável pela união mecânica. As junções oclusivas parecem quase como uma fusão de membranas celulares opostas, limitando a permeabilidade de acordo com a sua proximidade. Na camada de odontoblastos estas junções não envolvem completamente as células, limitando apenas a permeabilidade e não a eliminando. As junções oclusivas fornecem integridade mecânica à camada de odontoblastos. As junções comunicantes têm um papel importante na comunicação entre as células, em especial no sincronismo da atividade de todos os odontoblastos da camada. Permitem, ainda, o movimento direto de pequenas moléculas entre células adjacentes (Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014; Linde, 1995; Staquet *et al.*, 2006; Unda *et al.*, 2000). Os odontoblastos estão também ligados a outras células do tecido pulpar, em especial com as células dendríticas apresentadoras de antigénio com as quais têm uma relação muito próxima. As terminações nervosas estão, igualmente, muito próximas dos processos odontoblásticos nos túbulos dentinários e dentro da camada de odontoblastos. Esta íntima ligação tem sido sugerida como justificação para os odontoblastos funcionarem, eventualmente, como recetores sensitivos, enviando informações sobre a superfície de dentina através de sinapses químicas ou elétricas para as terminações nervosas. Acerca das sinapses químicas ainda não existe evidência, embora já tenham sido encontradas proteínas indicadoras de exocitose nos túbulos dentinários; mas a presença de sinapses elétricas é mais evidente pela atuação das junções comunicantes, que se apresentam morfológicamente semelhantes às existentes no tecido nervoso (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004). Os odontoblastos podem também participar na resposta pulpar inicial a diversas lesões assim como em estádios finais de reparação da lesão pulpar. Alguns estudos *in vitro* referem-nos como sendo capazes de produzir interleucina-8 (IL-8) quando em presença de toxinas bacterianas. A IL-8 é um quimiotático pró-inflamatório que participa no recrutamento de neutrófilos (Cavalcanti *et al.*, 2011; Levin *et al.*, 1999).

Os fibroblastos são as células mais frequentes nos tecidos conjuntivos não mineralizados e estão, também, presentes no tecido pulpar, ligados por junções do tipo aderente e do tipo comunicante, formando uma rede de tecido laxo. A sua morfologia é muito variável, embora sejam mais frequentes na sua forma estrelar, e produzem fibras extracelulares e substância fundamental da polpa. Esta produção e presumivelmente o *turn over* são lentos, pelo que a sua contribuição para a formação de dentina é pequena. A sua função prende-se mais com a renovação da matriz extracelular, participando tanto na sua formação como na degradação e tendo, por isso, uma quantidade limitada de organelos celulares, tais como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e as mitocôndrias. Alguns estudos celulares demonstram que, quando estimulados adequadamente, são capazes de produzir tecido duro e uma variedade de fatores de crescimento e citocinas, importantes no controlo do desenvolvimento, no crescimento e na resposta à lesão do tecido pulpar (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Sasaki e Garant, 1996).

As células de defesa presentes no tecido pulpar são os linfócitos T e os macrófagos. Os primeiros estão em pequeno número no tecido pulpar normal, mas aumentam no tecido pulpar lesionado ou submetido a um estímulo nocivo. Os macrófagos estão presentes no tecido pulpar normal, especialmente à volta dos vasos sanguíneos e da camada de odontoblastos. As células dendríticas apresentadoras de antigénio podem, também, ser encontradas na polpa, com distribuição semelhante à dos macrófagos. Têm cerca de 50 μm de comprimento e três ou mais processos dendríticos principais. Estas células apresentadoras de antigénio migram com o antigénio capturado para os gânglios linfáticos regionais e aí estimulam a atividade dos linfócitos T não ativados. A resposta do tecido pulpar à lesão é mediada pelos sistemas neuronal e imunitário, havendo uma relação íntima e uma resposta combinada entre as fibras nervosas e as células imunocompetentes (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Jontell *et al.*, 1998).

Quando sujeito a um estímulo nocivo, o tecido pulpar, em especial uma camada de células abaixo da camada de odontoblastos, tem a capacidade de produzir dentina terciária. Esta resposta pode dever-se a uma população de células mesenquimatosas primitivas pluripotenciais que se diferencia numa variedade de tipos celulares ou, à modificação da atividade de células já existentes por alteração da sua expressão génica. A estrutura e as propriedades do complexo

dentinho-pulpar estão intimamente relacionadas com cruciais interações matriz-célula. A regulação apropriada destas interações determina a resposta adaptativa pulpo-dentinária e é coordenada por importantes proteínas bioativas como os fatores de crescimento, as citocinas, as quimiocinas e os neuropeptídeos. As proteínas que modulam estas interações são coletivamente designadas por moléculas da matriz celular. Estas moléculas são expressas em diferentes fases durante a dentinogénese devido a propriedades quimioatrativas que chamam células endógenas da polpa dentária para a zona da lesão. A chegada destas células estimula a formação de dentina terciária o que permite a remodelação e a reparação do tecido pulpar bem como, a manutenção da vitalidade pulpar. A periostina, uma dessas moléculas, influencia a fibrinogénese do colagénio e tem um papel importante na manutenção da função do tecido, da sua integridade e da coesão (Olgart, 1996; Wiesen *et al.*, 2015).

A arquitetura dos vasos sanguíneos da polpa dentária é semelhante à organização dos seus feixes nervosos. As arteríolas entram e as vénulas saem da polpa dentária pelo *foreman* apical e ramificam-se por todo o sistema de canais até ao limite do tecido dentinário, sob a forma de capilares. Entre as células odontoblásticas existem vasos capilares que formam o plexo capilar subodontoblástico e que não se prolongam pelos túbulos dentinários. Este plexo sanguíneo capilar é fundamental para o suprimento de oxigénio e de nutrientes durante a dentinogénese (Bleicher, 2014; Goldberg, 2014). Os vasos linfáticos estão igualmente presentes na polpa dentária. A extensa inervação da polpa periférica está significativamente envolvida no controlo do fluxo sanguíneo. As paredes das arteríolas, revestidas por músculo liso, têm associados diversas terminações nervosas, designadas por *nervi vasorum*, e diversos vasos sanguíneos, designados por *vasa vasorum*. O neuropeptídeo mais prevalente nestas terminações é um peptídeo relacionado com a calcitonina, cuja ação principal é a vasodilatação. A substância P, o neuropeptídeo Y e a óxido nítrico sintetase também estão presentes e com uma ação semelhante (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004). O fluxo sanguíneo pulpar é pulsátil e é cerca de 20 a 60 ml/min por 100 g de tecido. Esta pulsatilidade, que traduz a grande complacências destes vasos sanguíneos, permite que o fluido dentinário se mova sempre que os túbulos dentinários estejam desobstruídos. Esta deslocação de fluidos explica a reduzida entrada de quaisquer irritantes

pulpaes durante, por exemplo, a progressão da cárie dentária (Andreasen, 2012; Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Olgart, 1996).

A polpa dentária tem uma inervação muito rica. As fibras nervosas entram na polpa dentária em feixes, embora exista um escasso perinervo ou epinervo. Estes feixes são compostos por fibras aferentes mielínicas do tipo A δ (1 a 6 μ m de diâmetro) e do tipo A β (6 a 12 μ m de diâmetro) e fibras do tipo C, amielínicas. Os feixes nervosos estão em associação muito próxima com os vasos sanguíneos, ramificando-se por todo o sistema de canais e termina nas regiões subodontoblástica e odontoblástica, onde forma o plexo de *Raschkow*, ou acompanham os processos odontoblásticos nos túbulos dentinários (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Byers e Närhi, 1999; Fried *et al.*, 2000). Os nervos aferentes, além do seu papel importante na função sensitiva, são também fundamentais na libertação de neuropeptídeos que controlam localmente o fluxo sanguíneo. Algumas das fibras do tipo C são eferentes simpáticas e suprem os músculos lisos das arteríolas mediando o efeito vasoconstritor pela libertação de noradrenalina e de neuropeptídeo Y. As evidências de inervação parassimpática do tecido pulpar são poucas, já que a acetilcolina é raramente detetada. A vasodilatação, como referido acima, é efetuada pela ação de nervos aferentes através de metabolitos locais, como o óxido nítrico. Este metabolito é produzido após hipoxia e consequente lesão tecidular, sendo a molécula sinalizadora de indução de vasodilatação sob essas condições (Andreasen, 2012; Bleicher, 2014; Byers e Närhi, 1999). As terminações nervosas nos túbulos dentinários, na zona de transição tecido pulpar e pré-dentina e entre os corpos celulares dos odontoblastos, não são revestidas pelas células de *Schwann* estando expostas à composição do fluido extracelular. As alterações na composição ou na movimentação deste fluido afetam as propriedades das membranas dessas terminações, nomeadamente através da libertação de neuropeptídeos. Existem diversos neuropeptídeos no tecido pulpar, com funções antagónicas. O peptídeo relacionado com a calcitonina é um potente vasodilatador que estimula a divisão celular de fibroblastos. Para além deste, fatores de crescimento e recetores nervosos expressos nos tecidos que sofrem lesão, têm igualmente um papel na quimiotaxia de leucócitos. Relativamente aos vasoconstritores simpáticos podemos referir a noradrenalina e o neuropeptídeo Y, entre outros (Nakashima, Iohara e Sugiyama, 2009).

CAPÍTULO II — DENTINOGÉNESE

A dentinogênese é um processo contínuo de deposição de matriz dentinária ao longo da vida do dente. A formação do tecido dentinário tem início quando se atinge o estágio de desenvolvimento de campânula. Nesta fase, a papila dentária está bem definida, juntamente com o epitélio interno do esmalte já diferenciado e preparado para secretar a matriz de esmalte. No início da dentinogênese a papila dentária passa a ser designada de polpa dentária que, embora seja um processo contínuo durante toda a vida, se subdivide em diferentes estádios: a diferenciação das células formadoras de dentina - os odontoblastos; a deposição da matriz orgânica - a pré-dentina; e a mineralização e modificação ao longo do tempo dessa matriz (Simon *et al.*, 2009).

Os odontoblastos derivam de células do tecido conjuntivo embrionário, designadas por células ectomesenquimatosas devido à sua origem, bem estabelecida, da crista neural. As células da crista neural migram precocemente para formar uma população na região do primeiro arco branquial ou faríngeo, formando um ectomesênquima que dá origem a todos os tecidos conjuntivos laxos e duros crânio-faciais (Arana-Chavez e Massa, 2004). Inicialmente, o epitélio oral primitivo espessa-se e prolifera no ectomesênquima subjacente, sofrendo uma condensação celular e estabelecendo-se a papila dentária. Uma série de interações epitélio-ectomesenquimatosas, reguladas e recíprocas, são responsáveis pelo início da formação do dente. Quando a odontogênese começa, embora a sinalização continue, a proliferação de células epiteliais é um evento que ocorre nos estádios de botão, de campânula e de sino. A diferenciação dos odontoblastos começa na extremidade das futuras cúspides, mas apenas depois do germen do dente ter atingido o estágio de sino e a forma da coroa ter sido estabelecida. As células ectomesenquimatosas da papila dental exibem uma relação núcleo/citoplasma elevada,

possuem vários processos curtos e contêm polirribossomas relativamente abundantes, mas o retículo endoplasmático rugoso (RER), o aparelho de Golgi e as mitocôndrias são raros. As moléculas de sinalização surgem nas células epiteliais assim que iniciam a sua diferenciação em ameloblastos, possivelmente modificando a lâmina basal interna para induzir as células externas pós-mitóticas da papila dentária a se diferenciar em odontoblastos. Os odontoblastos diferenciadores iniciam a secreção da dentina antes do início da secreção da matriz do esmalte pelos ameloblastos (Arana-Chavez e Massa, 2004; Niño-Barrera, Gutiérrez e Garzón-Alvarado, 2013; Srisuwan *et al.*, 2012).

As células formadoras de dentina, os odontoblastos são, pois, células pós-mitóticas altamente diferenciadas, capazes de secretar componentes da matriz dentinária primária, secundária e terciária (Murray *et al.*, 2003). Como já referido, a diferenciação morfológica dos odontoblastos tem início nas células da papila dentária adjacentes à membrana basal do epitélio interno do esmalte, logo abaixo do que virão a ser as cúspides ou os bordos incisais. Inicialmente, estas células pré-odontoblásticas não têm organelos bem desenvolvidos nem uma organização específica. Modificações na composição da membrana basal do esmalte limitadas no tempo, ocorrem simultaneamente com a diferenciação dos odontoblastos. De entre elas podemos referir a expressão e localização da laminina, os proteoglicanos contendo condroitina, as proteínas do esmalte e a presença de fibronectina e de decorina no polo distal das células, bem como a presença de fatores de crescimento como o TGF, o IGF (do inglês, *insulin-like growth factor*) e o BMP (Melin *et al.*, 2000; Srisuwan *et al.*, 2012; Tonomura *et al.*, 2007). Sob estes estímulos ocorre uma hipertrofia celular, com alongamento da célula, dando-lhe uma forma cilíndrica. Simultaneamente, ocorre a polarização celular com deslocamento do núcleo para a parte basal, oposta ao epitélio interno do esmalte, juntamente com o aumento de tamanho dos organelos de síntese, nomeadamente o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso. O aparelho de Golgi fica na região supranuclear, enquanto que o retículo endoplasmático rugoso ocupa a maior parte do citoplasma distal. Este alongamento e polarização das células é acompanhado por uma redistribuição de proteínas como a actina, a vinculina e a vimentina do esqueleto intracelular, bem como a expressão da nestina e da citoqueratina. Além disto, também ocorrem alterações na membrana das células, como o aumento da expressão de

proteínas que se ligam à fibronectina. Nesta fase, muitos processos celulares pequenos iniciam a sua formação em direção à membrana basal do epitélio interno do esmalte. No entanto, à medida que a diferenciação evolui, o número de processos odontoblásticos reduz-se, ficando apenas o maior. As junções celulares, particularmente entre odontoblastos, mas também entre odontoblastos e células pré-odontoblásticas aumentam em número. Estas junções podem ser célula a célula, oclusivas, comunicantes ou mácula aderente como já referido atrás (Arana-Chavez e Massa, 2004; Bleicher, 2014; Garant, 2003).

Dentinogénese primária

Quando os odontoblastos estão completamente diferenciados, começam a secretar a sua matriz orgânica (4-20 $\mu\text{m}/\text{dia}$), constituída por diversos elementos, nomeadamente, fibras de colagénio, proteoglicanos, glicoproteínas e sialoproteínas, fosfoproteínas, fatores de crescimento e lípidos (Bleicher, 2014). O elemento mais abundante da matriz dentinária é o colagénio do tipo I, seguido pela fosfoproteína da dentina, DPP, sendo esta última, juntamente com a DSP, exclusivas do tecido dentinário e com um papel significativo na mineralização do mesmo. As fibras de colagénio do tipo I são secretadas, numa fase inicial, pelo corpo do odontoblasto e depositadas perpendiculares à futura junção amelodentinária (Couple *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2009; Yamamoto, Oida e Yamakoshi, 2015). Uma vez depositada a camada inicial do manto, a dentina circumpulpar primária é depositada num padrão incremental regular. Para além da deposição de colagénio, o processo odontoblástico secreta outras proteínas não colagénicas, como a fosforina, que se liga ao colagénio em ligações altamente específicas com as fibrilhas das *gap junctions* (Arana-Chavez e Massa, 2004; Larmas e Sándor, 2014). Após a formação do manto de dentina, o colagénio do tipo I remanescente é depositado com as fibras paralelas à linha pulpodentinária. A deposição da nova matriz ocorre a um ritmo semelhante ao da mineralização, de tal forma que existe sempre uma camada não mineralizada, a pré-dentina na superfície pulpar do tecido dentinário. A mineralização da dentina é um processo totalmente dependente dos odontoblastos, e só ocorre na sua presença. São eles que controlam o transporte e a libertação de iões cálcio e determinam a presença e a distribuição dos componentes da

matriz que podem iniciar e modular o processo. Assim, a mineralização inicia-se com o transporte ativo de íons cálcio para o local da mineralização, que se acumulam inicialmente na porção distal do processo e se ligam a vários organelos. O cálcio transportado pelos odontoblastos torna-se, na dentina, num mineral cristalino por deposição sob um substrato formado por fibrilhas de colagénio do tipo I. Este processo é controlado pela proteína não colagénica predominante na dentina, a DPP (Couble *et al.*, 2000). A DPP é aniónica pelo que se liga facilmente ao cálcio. Esta proteína tem a capacidade de se alterar estruturalmente, o que permite a ligação crescente de íons cálcio com formação, crescimento e estabilização da unidade mineralizada do tecido dentinário. Por outro lado, em grandes concentrações, a DPP inibe a formação do cristal. Assim, através do controlo da libertação e da concentração da DPP, o odontoblasto controla a fase inicial da mineralização assim como a taxa de deposição (Niño-Barrera, Gutiérrez e Garzón-Alvarado, 2013). Além desta proteína existem outras que participam no processo de mineralização tais como: as proteínas não colagenosas (do inglês *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*—SIBLINGs) como a osteopontina (do inglês *osteopontin* - OPN), a DSP e a DMP-1; a osteonectina (do inglês *osteonectin* — ON) e a fosfoglicoproteína da matriz extracelular (do inglês *matrix extracelular phosphoglycoprotein*—MEPE); e os proteoglicanos pequenos ricos em leucina (do inglês *small leucine-rich proteoglycan* —SLRP) como o biglicano, a decorina, a fibromodulina, o lumican e a osteoaderina (Bleicher, 2014; Simon *et al.*, 2009; Yamamoto, Oida e Yamakoshi, 2015; Zurick, Qin e Bernards, 2013). A osteonectina, é uma proteína fosforilada produzida pelo odontoblasto que inibe o crescimento dos cristais de hidroxiapatite e que promove a ligação do cálcio e do fosfato ao colagénio. A osteopontina é também uma proteína fosforilada capaz de promover a formação mineral na dentina, tal como a sialoproteína presente no processo inicial de mineralização da dentina, e na dentina peritubular (Arana-Chavez e Massa, 2004; Couble *et al.*, 2000; Niño-Barrera, Gutiérrez e Garzón-Alvarado, 2013; Smith *et al.*, 2012). Existem, ainda, outros processos envolvidos na fase inicial da mineralização como a nucleação mediada pela DPP sobre as fibrilhas colagénicas. À medida que o processo odontoblástico se retrai, alguns restos celulares permanecem localmente e formam “vesículas matriciais”, nas quais se forma o manto de dentina. Além disso, ocorre no seu interior a formação de organelos cuja membrana contem várias enzimas,

nomeadamente a fosfatase alcalina (do inglês *alkaline phosphatase* — ALP). Esta enzima, em particular, eleva a concentração de iões fosfato dentro da vesícula, o que leva à formação de cristais minerais. Estas estruturas cristalinas apenas estão presentes, muito precocemente na formação do manto de dentina. A deposição da matriz e a mineralização ocorrem continuamente havendo, na frente de mineralização, padrões irregulares, em especial áreas onde a mineralização progride de uma forma linear, outras em forma de esferas (calcosferritos) que eventualmente se fundem, enquanto outras mostram uma combinação das duas. Os vários padrões de mineralização são comuns em toda a dentina (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Bleicher, 2014; Larmas e Sándor, 2014).

Dentinogénese secundária ou fisiológica

Após a secreção da maior parte da dentina circumpulpar durante a dentinogénese primária, a secreção da dentina secundária fisiológica continua a uma taxa muito mais lenta (cerca de 0,4 $\mu\text{m}/\text{dia}$) durante a vida biológica do dente (Smith *et al.*, 2012).

A formação de dentina secundária fisiológica leva a uma lenta redução no tamanho da câmara de polpa, à medida que a matriz é depositada circumpulparmente (Bleicher, 2014). Esta redução da taxa de dentinogénese deve-se a uma diminuição da atividade odontoblástica que se reflete, também, na aparência das células (Pashley, 1996). Vários estudos morfológicos indicam alterações na célula odontoblástica, que incluem o encurtamento do corpo celular e a diminuição no número de organelas responsáveis pela síntese e pela secreção da célula. No entanto, os odontoblastos pós-mitóticos originais, responsáveis pela dentinogénese primária, sobrevivem durante a vida do dente, a menos que sejam sujeitos a traumas. Essencialmente, a célula entra em estado de repouso após a dentinogénese primária e a formação limitada de dentina secundária ao longo de várias décadas, representa o nível basal de atividade destes odontoblastos em estado quiescente (Bleicher, 2014; Franquin *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2009). Estudos recentes referem que os odontoblastos de dentes permanentes desenvolvem um sistema autofágico-lisossomal, com funções de *turnover* e de degradação de componentes celulares, sendo responsável pela organização do normal funcionamento destas células durante

décadas. A redução desta atividade autofágica, em dentes envelhecidos, está associada a uma progressiva acumulação de grânulos de lipofuscina e podem comprometer a sobrevivência dos odontoblastos (Franquin *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2012). Para alguns autores, a formação completa da raiz é o ponto em que termina a formação de dentina primária (Bleicher, 2014; Goldberg *et al.*, 2011) e se inicia a formação de dentina secundária, enquanto que para outros esta transição ocorre quando se inicia a erupção do dente (Smith *et al.*, 2012; Tziafas, 1994; Tziafas, Smith e Lesot, 2000). Até agora, o ponto absoluto em que a atividade dos odontoblastos se modifica, refletindo a transição da secreção de dentina primária para secundária, está indefinido. Sem alterações fenotípicas é difícil delimitar, no espaço e no tempo, os dois tipos de dentinogênese, que até poderão ocorrer concomitantemente no mesmo dente, dependendo do estágio de desenvolvimento (Simon *et al.*, 2009).

Dentinogênese terciária ou reparativa

Dependendo da resiliência do órgão pulpar e da severidade da lesão, a polpa dentária pode entrar num processo de necrose ou num processo de resposta defensiva. Esta reação defensiva a estímulos nocivos pode ter vários mecanismos, nomeadamente através da precipitação de calcificações intrapulpares, da deposição de dentina peritubular com formação de dentina terciária, ou da redução da permeabilidade da dentina pré-existente (Sangwan *et al.*, 2013). A forma mais frequente do complexo dentino-pulpar responder a traumatismo ou a lesão (cárie, atrição, erosão, materiais de restauração dentária, entre outras) é através da formação de uma barreira de tecido mineralizado. Esta resposta caracteriza-se pela deposição focal, sob a lesão, de uma matriz dentinária terciária, que tem como objetivo fundamental criar uma barreira entre o local da lesão e as células pulpares. A matriz dentinária terciária pode ter estrutura tubular variável o que, de certo, influenciará a permeabilidade dentinária nesta região. Estas propriedades da barreira da matriz de dentina terciária são fundamentais tanto para a proteção da vitalidade pulpar como para a obtenção de uma base mais sólida de tecido duro que é importante para subsequente restauração do tecido lesado. Podemos, assim, dizer que a

natureza das respostas dentinogênicas terciárias pode ser importante na determinação das propriedades da nova matriz (Murray *et al.*, 2003; Tziafas, 1994, 1995).

A dentinogênese reacional resulta das atividades dos odontoblastos pós-mitóticos, responsáveis pela formação da dentina primária, pelo que pode ser considerada como uma extensão da dentinogênese fisiológica. No entanto, é uma resposta patológica a uma lesão e, como tal, deve ser considerada distinta das dentinogêneses primária e secundária. Representa uma regulação positiva das atividades de síntese e de secreção dos odontoblastos a partir de um estado relativamente latente durante a dentinogênese fisiológica (Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014; Sangwan *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 1995). A possibilidade de regeneração do tecido pulpar é restrita devido, não só à disposição anatômica da câmara pulpar, como ao reduzido suprimento sanguíneo colateral da polpa dentária que prejudica a capacidade do sistema imunológico de combater as infecções (Cooper *et al.*, 2010; Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014). Além disso, os odontoblastos são células pós-mitóticas que têm capacidade de proliferação nula ou muito limitada (Demarco *et al.*, 2011). No caso de lesão ligeira do tecido dentário, os odontoblastos responsáveis pela secreção primária da dentina frequentemente sobrevivem e são estimulados a secretar uma matriz dentinária reacional, na interface polpa-dentina sob o local da lesão. Uma vez que os odontoblastos primários originais são responsáveis por esta secreção matricial, haverá continuidade tubular e comunicação com a matriz dentinária primária, formando-se um tecido designado de ortodentina (Pashley, 1996; Smith *et al.*, 2012, 2012).

Em contraste com a resposta formadora de dentina reacional, a dentinogênese reparadora representa uma sequência mais complexa de processos biológicos como se observa na Figura 3. Antes da regulação positiva da secreção da matriz, a migração e a diferenciação das células progenitoras pulpares, as stem cells, deve ocorrer para dar origem a uma nova geração de células tipo odontoblastos (Linde e Goldberg, 1993; Simon *et al.*, 2009; Tziafas, 1994). Concomitantemente, ocorre uma série de reações de cicatrização no tecido conjuntivo pulpar, acompanhada de uma reação inflamatória generalizada.

Quando as lesões são mais graves, os odontoblastos imediatamente abaixo da lesão podem morrer. Tanto o trauma como a infecção bacteriana podem levar à libertação de neuropeptídeos

e ao aumento da permeabilidade capilar, donde resulta a produção de transudato que se acumula entre a camada de odontoblastos e a pré-dentina o que, por sua vez, pode levar à rutura dos complexos juncionais inter-odontoblásticos (Embery *et al.*, 2001). A libertação de mediadores inflamatórios e de citocinas pode contribuir para o processo de cicatrização do tecido pulpar ou para reações inflamatórias mais generalizadas através do aumento da permeabilidade vascular e da pressão tecidual no ambiente pulpo-dentinário (Cooper *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2003). Estes fatores de crescimento podem ser libertados devido ao ambiente ácido provocado pela lesão de cárie. Se as condições adequadas prevalecerem dentro do tecido pulpar, as células progenitoras são estimuladas a diferenciar-se numa nova geração de células semelhantes a odontoblastos e a secretar uma matriz reparadora da dentina (designada de osteodentina) (About, 2011; Cooper *et al.*, 2010; Ranly *et al.*, 1997). Esta nova matriz implica descontinuidade na estrutura tubular, com subsequente redução da permeabilidade dentinária. Podem ser observadas respostas não-específicas que levam à deposição de fibrodinina ou matriz osteotípica atubular, mas não representam uma indução verdadeira de dentinogénese reparadora (Bleicher, 2014). A morte de alguns odontoblastos e a sobrevivência de outros pode levar à formação de uma matriz dentária terciária reacional menos organizada e mineralizada, com menor densidade tubular e com apenas parte das propriedades de permeabilidade da dentina primária (Demarco *et al.*, 2011). Esta modificação da permeabilidade é fundamental pois condiciona alteração da difusão que, em conjunto com a da capilaridade, pode permitir que substâncias tóxicas atinjam a polpa, através da matriz dentinária e dos túbulos dentinários, que podem atuar como irritantes se a concentração atingir um limiar inflamatório (Cooper *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2012, 2012). A concentração de substâncias que se difundem através da dentina para o tecido pulpar depende, em parte, da taxa de remoção das toxinas através da circulação pulpar e do coeficiente de filtração da dentina (Tziafas, Smith e Lesot, 2000). Tendo em conta a composição e o arranjo morfológico, a permeabilidade da matriz de dentina, secretada após a lesão, pode ser muito importante no comportamento clínico dos tecidos.

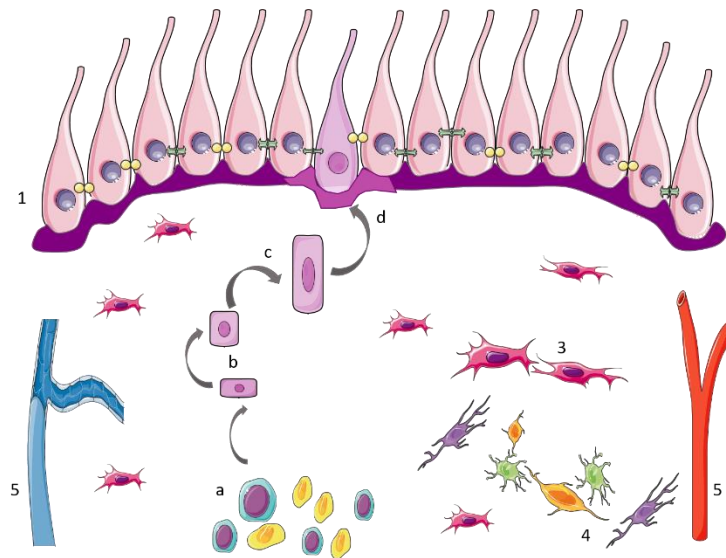


Figura 3: Esquema ilustrativo dos diferentes processos biológicos que ocorrem na dentinogênese reparadora. O limite externo do tecido pulpar, isto é, a transição com o tecido duro dentinário, é formado por uma monocamada de células com forma tubular e com diversas ligações celulares, a camada odontoblástica (1). O interior da polpa dentária (2) é composto por um tecido de sustentação complexo com diversos tipos de células e um plexo vasculo-nervoso. Quando ocorre um traumatismo no tecido pulpar, com perda da integridade da camada externa, é desencadeada uma cascata de processos no sentido da reparação desta lesão, designada por dentinogênese reparativa ou reparadora. Células indiferenciadas (*stem cells*) (a) presentes no interior do tecido pulpar são estimuladas por diversos fatores, ocorrendo migração (b) e diferenciação (c) até células tipo-odontoblasto. As células tipo-odontoblasto diferenciadas substituem os odontoblastos lesados na zona onde ocorreu o traumatismo (d). Simultaneamente, ocorrem reações de cicatrização no tecido conjuntivo pulpar através dos fibroblastos pulpaes (3), de diversas células nervosas (4) e de alterações vasculares arteriais e venosas (5). Adaptado de (Tziafas, Smith e Lesot, 2000) e de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Tem sido sugerido que, em termos clínicos, um dos objetivos principais de uma proteção pulpar direta deve ser a redução da permeabilidade dentinária como ocorre na dentina em resposta à lesão. Embora a manutenção da arquitetura normal dos tecidos tubulares possa ser considerada uma característica importante de qualquer estratégia de reparação tecidual, isto não se justifica quando existe o risco de lesões teciduais resultantes da difusão tubular de agentes nocivos. Foram descritos três padrões de reação da dentina que se traduzem na redução da permeabilidade. Estes padrões são a aposição de dentina peritubular, a precipitação de cristais intratubulares e a formação de dentina reativa menos permeável. O objetivo de qualquer

estratégia terapêutica deverá ter em conta estes padrões (Bleicher, 2014; Demarco *et al.*, 2011; Ranly *et al.*, 1997).

O processo da dentinogênese nas suas diversas vertentes, quer fisiológicas, quer patológicas foi descrito atrás numa perspectiva macroscópica, isto é, baseado na composição e nas propriedades estruturais do tecido dentinário. No entanto, este tecido é uma matriz bioativa, onde moléculas bioativas interagem nas diversas etapas da formação e reparação do tecido dentinário. Assim, é fundamental compreender as suas potenciais ações nas células do complexo dentino-pulpar, para que o seu potencial seja explorado clinicamente. Entre estas biomoléculas, existem as proteínas específicas da dentina produzidas pelos os odontoblastos, como a DSP e a DPP. Estas são codificadas por um único gene conhecido como *DSPP* (do inglês, *dentin sialophosphoprotein gene*). A expressão deste gene está associada à dentinogênese e ocorre após a formação de uma matriz colagénica de pré-dentina. A DSP e a DPP são produzidas abundantemente pelos odontoblastos e em níveis muito baixos noutros tecidos, tais como o osso e o rim. A DMP-1, outra proteína específica da dentina, foi descrita como reguladora da sua mineralização, semelhante à DSP e à DPP (Butler, 1995). O gene codificador da DMP-1 também desempenha um papel regulador na organização da matriz colagénica e pode funcionar como um sinalizador. Portanto, a regulação positiva de DSP e DMP-1 é considerada indicativa de odontoblastos maduros (Butler, 1998; Smith *et al.*, 2012; Tziafas, Smith e Lesot, 2000; Yamamoto, Oida e Yamakoshi, 2015). Também o gene *ALP* (do inglês, *alkaline phosphatase gene*) é um marcador conhecido para a deteção de diferenças osteogénicas das células. Assim, na diferenciação de células em linhagem osteogénica, a sua expressão está aumentada. Além disso, a ALP é também uma ectoenzima envolvida na degradação do pirofosfato inorgânico, com o objetivo de libertar fosfato, na fase de citodiferenciação, para a mineralização. Portanto, é um marcador biológico para o *turnover* ósseo. Considera-se que a ALP desempenha um papel chave na mineralização da dentina reparadora e o colagénio do tipo I é o colágeno predominante na dentina que fornece estrutura para a deposição inorgânica (Hillmann e Geurtsen, 1997). A ALP e o colagénio do tipo I são marcadores proteicos do desenvolvimento precoce do odontoblasto pois estão associados a uma atividade intensa da célula. Existem outros marcadores proteicos de desenvolvimento tardio, como a osteocalcina (do inglês *osteocalcin* - OCN) que é indicadora

da entrada das células em fase quiescente. A OCN é uma proteína não colagenosa, encontrada principalmente no osso e na dentina que desempenha um papel regulador na mineralização do tecido duro e na homeostase do íon cálcio. A produção de OCN é restrita a células que têm uma capacidade mineralizadora, incluindo os osteoblastos, os odontoblastos e os cementoblastos e é vista como um indicador da finalização da regeneração de tecidos duros (Ranly *et al.*, 1997). A OPN é um ácido siálico multifuncional, rico em glicoproteína fosforilada altamente expressa no osso, no tecido dentário e em vários locais de calcificação patológica de tecidos moles. A OPN é um marcador intermediário importante, relacionado tanto com a formação óssea como com a reabsorção (Butler e Ritchie, 1995; Li *et al.*, 2011; Shimazu, Nanci e Aoba, 2002). Além disso, a OPN contém a sequência de arginina-glicosina-aspartato de ligação à integrina, mediando assim a interação célula-matriz de modo a induzir aderência, migração e citodiferenciação (Butler e Ritchie, 1995; Rathinam *et al.*, 2015). Também a expressão do gene *Runx2* (do inglês *runt-related transcription factor 2 gene*) é necessária para o desenvolvimento dos dentes, especialmente para a diferenciação dos odontoblastos, mas com uma expressão inversa dependente do tempo. A *Runx2* determina a linhagem dos osteoblastos e dos odontoblastos das células mesenquimatosas. Assim, a produção de *Runx2* aumenta durante a maturação de células ósseas, isto é, na diferenciação de células pré-osteoblásticas para osteoblastos e depois para osteócitos (Semeghini *et al.*, 2012). No entanto, o seu padrão de produção é diferente nas células dentárias, aumentando tanto nos pré-odontoblastos como nos odontoblastos imaturos, mas diminuindo durante a fase de diferenciação final. Também a família do fator de crescimento de transformação β desempenha um papel fundamental na regulação de uma ampla gama de respostas celulares, incluindo o crescimento celular e a diferenciação (Camps *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2011; Magloire *et al.*, 2001). Os membros desta família incluem o TGF- β 1, o TGF- β 2, o TGF- β 3, as ativinas, as BMPs e outros fatores relacionados que regulam a proliferação e a diferenciação celular, a alteração epitélio-mesenquima e a maturidade embrionária (Smith *et al.*, 1995). O TGF- β 1 é uma citocina multifuncional que pode induzir a diferenciação das células mesenquimatosas em relação ao fenótipo dos osteoblastos (About, 2011; Smith *et al.*, 2012; Smith e Lesot, 2001; Tziafas, Smith e Lesot, 2000). Deve ser mantido um equilíbrio entre a promoção e a mineralização no tecido duro, a dentina, e no tecido mole dos dentes, a polpa

dentária, em condições normais ou patológicas. Muitos estudos têm-se concentrado nos reguladores positivos da mineralização da dentina, e pouca investigação existe acerca dos fatores inibitórios que também podem desempenhar um papel fundamental durante o processo (Magloire *et al.*, 2001; Rathinam *et al.*, 2015).

As biomoléculas, atrás referidas, têm um papel fundamental na resposta imunitária ao trauma e à infeção do complexo dentino-pulpar associadas a outros processos, especialmente neuronais. Durante a infeção por cárie dentária, a polpa desenvolve uma resposta imune às bactérias orais que penetram nos tecidos duros dentários periféricos, como o esmalte e dentina. Devido à sua situação, os odontoblastos são as primeiras células que os agentes patogénicos orais, essencialmente bactérias gram-positivas como o *Streptococcus*, o *Lactobacillus* e o *Actinomyces*, encontram (Poggio *et al.*, 2014). No entanto, a progressão da doença induz uma alteração no perfil bacteriano, com diminuição da proporção de bactérias aeróbias gram-positivas e aumento de bactérias anaeróbias gram-negativas, principalmente a *Fusobacterium*, a *Prevotella* e a *Tannerella* (Cooper *et al.*, 2010; Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014). O fator de necrose tumoral α (TNF- α do inglês *tumor necrose factor alpha*) é produzido principalmente por fagócitos mononucleares com o objetivo de estimular os neutrófilos e recrutar monócitos para o local da infeção, ativando-os para erradicar os microorganismos. Nas lesões apicais, o TNF- α , a interleucina (do inglês *interleukine* - IL) -1-a, a IL-1-b, o TNF- β , a IL-6 e a IL-11 atuam na reabsorção óssea e constituem, coletivamente, o fator de ativação osteoclástica (Cavalcanti *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2009). A IL-8 é expressa maioritariamente pelos odontoblastos (Magloire *et al.*, 2001; Smith e Lesot, 2001; Smith *et al.*, 2001, 2012). Os odontoblastos estão intimamente relacionados com a cadeia neuronal, designado de plexo de *Raschkow*, uma vez que o complexo pulpo-dentinário e os odontoblastos têm origem nas células da crista crânio-neuronal. Assim, é obvio que a produção dos neuropeptídeos e dos fatores neurotróficos é efetuada nos odontoblastos e têm implicações na sua função (Byers e Närhi, 1999; Olgart, 1996). De facto, recentemente alguns autores referem a contribuição da resposta neuro-inflamatória para a defesa tecidual da polpa durante o trauma ou a infeção (Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014; Murray *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2012). A sinalização molecular mediada pelos neurónios simpáticos é importante para a vaso-regulação e o recrutamento de células do

sistema imunitário. A inervação do órgão dentário participa diretamente na resposta imune inata durante o processo designado por inflamação neurogênica. Conseqüentemente, os nervos aferentes respondem aos antígenos bacterianos pela libertação de neuropeptídeos, o que seqüentemente, recruta e ativa as células do sistema imune, devido à presença de recetores superficiais para estes neuropeptídeos (Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014; Smith *et al.*, 2012). Os odontoblastos estão envolvidos na detecção rápida destes patógenos, através de recetores de reconhecimento. Estes recetores de sinalização podem ser divididos em três classes que incluem os recetores TLRs (do inglês *toll-like receptors*), os recetores RLRs (do inglês *RIG-I-like receptors*) e os recetores NLRs (do inglês *NOD-like receptors*). Os TLRs, bem como os NLRs reconhecem uma grande variedade de moléculas associadas a patógenos PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*). Os TLRs são recetores ligados à membrana celular ou endossomal, enquanto que os NLRs são citosólicos. Assim, os NLRs representam uma segunda linha de defesa contra patógenos que evitam a superfície celular ou PRR endocíticos (do inglês *pattern recognition receptors*) (Bleicher, 2014; Cooper *et al.*, 2010; Couve, Osorio e Schmachtenberg, 2014).

Como já foi referido, a polpa dentária contém células progenitoras que podem proliferar e diferenciar-se em células do tipo-odontoblasto, e podem substituir os odontoblastos após uma lesão de cárie ou procedimentos operatórios. Tem sido sugerido que os componentes morfogénicos libertados da matriz dentinária têm um papel importante na proliferação e na diferenciação das *stem cells* em células do tipo odontoblasto (Salehi *et al.*, 2016). Estudos recentes revelam que a dentina tratada com alguns materiais, nomeadamente sistemas de adesão, hidróxido de cálcio ou agregados trióxidos minerais, solubilizam a dentina e libertam várias moléculas potencialmente bioativas, como fatores de crescimento, formadas e sequestradas do interior da dentina. Estas moléculas têm a capacidade de promover a diferenciação das células progenitoras em células do tipo-odontoblasto que secretam uma matriz extracelular para a formação de um novo tecido mineralizado, o que permite o estabelecimento de ligações entre a hidroxiapatite, como já foi descrito atrás (Ferracane, Cooper e Smith, 2010; Salehi *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2012).

CAPÍTULO III – EXPOSIÇÃO PULPAR E TERAPÊUTICAS

A exposição do tecido pulpar ao meio ambiente externo ocorre, como se encontra esquematizado na Figura 4, quer por iatrogenia, via instrumentação, quer por cárie profunda ou traumatismo dentário.

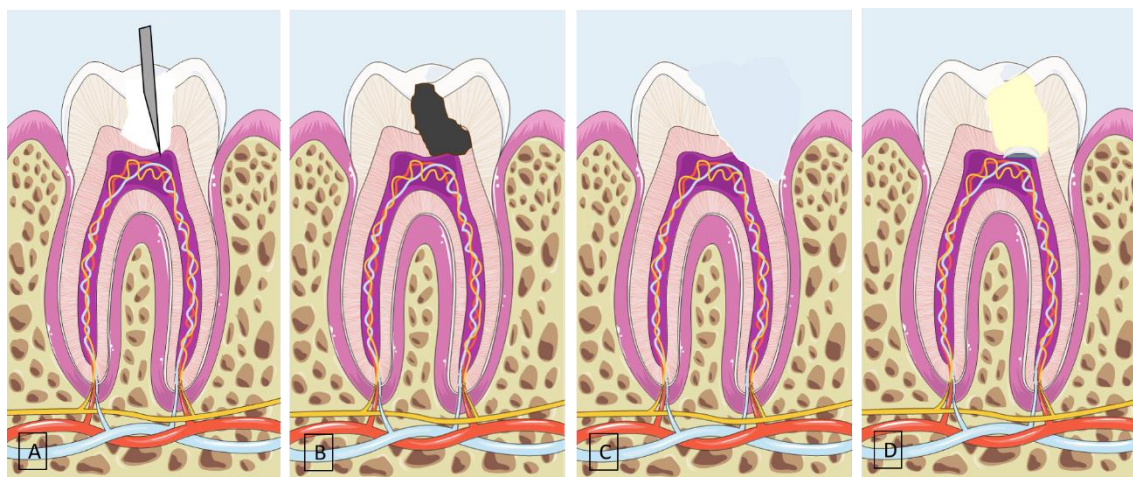


Figura 4: Causas da exposição do tecido pulpar ao meio ambiente externo e proteção do tecido pulpar exposto. A – Exposição pulpar causada por instrumentos de forma iatrogênica; B – Exposição pulpar causada por lesão cáriosa; C – Exposição pulpar causada por traumatismo com fratura coronária; D – Proteção pulpar direta do tecido exposto com biomaterial, junto à zona da polpa dentária lesada, e reparação da restante estrutura dentária perdida com um material restaurador. Esquema adaptado de Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

A polpa dentária possui um potencial natural de reparação tecidual, o que leva à formação de dentina reparadora. Tem sido bem documentado que a polpa dentária possui a capacidade de formar uma barreira de tecido duro (ponte dentinária) após o revestimento direto da polpa ou pulpotomia. Durante a dentinogênese reparadora, os odontoblastos originais, no local de exposição, são destruídos e substituídos por células do tipo odontoblastos recém-diferenciadas.

Como já descrito, a cicatrização do tecido pulpar envolve a migração de células estaminais ou progenitoras para o local lesado e a subsequente proliferação e diferenciação em células tipo odontoblastos. A dentinogênese reparadora é, muitas vezes, iniciada pela formação de uma matriz de fibrodentina atubular e/ou irregular que está associada a células cúbicas (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004). A formação de uma matriz do tipo dentina tubular, por células alongadas e polarizadas tipo odontoblastos, ocorre mais tarde. Durante o desenvolvimento dentário, a diferenciação odontoblástica é controlada por interações epitélio-mesenquimatosas mediadas por membranas basais específicas, como referido atrás. A fibronectina, uma glicoproteína da matriz extracelular encontrada em associação com a membrana basal dentária, parece desempenhar um papel crucial na diferenciação terminal dos odontoblastos (Ferracane, Cooper e Smith, 2010; Goldberg, 2014; Song *et al.*, 2017). Por outro lado, durante a dentinogênese reparadora, quando a membrana basal ou o epitélio dentário está ausente, a adesão de células progenitoras a uma superfície apropriada pode ser um requisito crítico para a diferenciação de células formadoras de tecido duro (Akhlaghi e Khademi, 2015; Poggio *et al.*, 2014). Quando um biomaterial é aplicado no tecido pulpar exposto, uma camada de calcificação distrófica associada à degeneração celular, pode ser a superfície à qual as células se ligam e onde, subsequentemente, se diferenciam em células semelhantes a odontoblastos. Este processo é mediado pela fibronectina depositada nesta camada, estruturalmente comparável à membrana basal. A formação da matriz dentinária tipo tubular é precedida pela deposição de fibrodentina que contém fibronectina. A fibrodentina pode ser comparável à dentina do manto, observada nos dentes em desenvolvimento, e tem sido sugerido como fundamental o papel que desempenha na diferenciação final dos odontoblastos (Bae *et al.*, 2012; Goldberg e Septier, 2002; Song *et al.*, 2017; Tziafas, Smith e Lesot, 2000). Recentemente, demonstrou-se que os íons de cálcio libertados do hidróxido de cálcio são capazes de estimular a expressão do gene da fibronectina em células da polpa dentária. Durante a dentinogênese reparadora, após a reparação da zona exposta, foram detetadas no local de exposição e na matriz fibrosa, a sialoproteína óssea (do inglês *bone sialoprotein* – BSP) e OPN, enquanto as células tipo odontoblasto demonstraram expressar a sialoproteína da dentina (Okiji e Yoshida, 2009). A sialoproteína óssea e a osteopontina são sugeridas como fundamentais para controlar o

processo de mineralização. Estas proteínas não colagénias podem estar associadas com a camada calcificada inicialmente formada por baixo da zona necrótica superficial. Além disso, a OPN está implicada em diversos eventos biológicos, como diversos processos de cicatrização. A expressão do gene *OPN* em células do tecido pulpar dentário é estimulada pela fibronectina (Goldberg *et al.*, 2003; Shimazu, Nanci e Aoba, 2002). O aparecimento da fibronectina e da OPN no local de exposição da polpa sugere o seu papel na migração das células progenitoras e na sua diferenciação em células tipo odontoblastos, durante a dentinogénese reparadora (Okiji e Yoshida, 2009). O TGF- β e outros membros desta família de fatores de crescimento, têm sido implicados no desenvolvimento do órgão dentário e na reparação do tecido dentário, como referido atrás. As isoformas de TGF- β e seus recetores foram identificados em odontoblastos de dentes saudáveis e cariados e, o recetor do tipo I de TGF- β foi identificado em proteções pulpares em modelo animal (Dammachke *et al.*, 2010; Srisuwan *et al.*, 2012). Foi demonstrado que o TGF- β 1 se liga à fibronectina imobilizada (Butler, 1995; Li *et al.*, 2011). Matrizes extracelulares, como proteoglicanos, têm sido sugeridas para se ligarem a muitos fatores de crescimento e, assim, modular as suas atividades. Durante os processos reparadores, a matriz rica em fibronectina serve como um reservatório de fatores de crescimento, bem como de substrato para a migração e ligação das células (Embery *et al.*, 2001). Estes fatores de crescimento incluindo o TGF- β e outras moléculas indutivas, expressas no tecido pulpar, podem estar envolvidos na diferenciação celular das células tipo-odontoblasto (Larmas e Sándor, 2014; Smith *et al.*, 2001, 1995).

A proteção pulpar direta consiste na aplicação de materiais biocompatíveis e bioindutores na zona de exposição do tecido, com vista a selar a comunicação, numa tentativa de atuar como barreira, e ao mesmo tempo proteger o complexo pulpar e, conseqüentemente, preservar a sua vitalidade. As características fundamentais destes materiais são a sua biocompatibilidade que inclui a capacidade antibacteriana e propriedades indutoras de cicatrização tecidual; a sua citocompatibilidade; e a sua capacidade seladora da lesão (Poggio *et al.*, 2014, 2014). Vários autores referem que a indução da formação de tecido mineralizado pelas células pulpares é a principal função do biomaterial utilizado para este tipo de terapêutica (Poggio *et al.*, 2014). O objetivo de uma terapêutica regenerativa de proteção pulpar direta é a indução da diferenciação

de células tipo-odontoblasto e, conseqüentemente, a formação de dentina terciária na área de exposição com reorganização da estrutura tecidual. Como já descrito, e na dependência do grau de gravidade da lesão, os defeitos dentinários são reparáveis pela regulação da atividade biossintética dos odontoblastos primários (formação de dentina reaccional) e/ou pela formação de osteodentina (formação de dentina terciária ou reparadora). Existem características que são comuns à maioria dos biomateriais indicados para terapêuticas de prevenção da vitalidade do tecido pulpar e que são indutoras de dentina reparadora. Entre estas características incluem-se o elevado pH, a atividade antimicrobiana e a liberação de íons de cálcio. O ambiente alcalino é conhecido por promover a diferenciação osteogênica e a formação de tecido ósseo. Inversamente, demonstra-se que em ambiente ácido esta formação está comprometida (Shie *et al.*, 2009). A fosfatase alcalina, uma enzima importante na iniciação do processo de mineralização, permite o aumento da concentração local de fosfato inorgânico, num pH alcalino (O'Connor *et al.*, 2008). Outras características comuns são a atividade antimicrobiana, pela liberação dos íons hidroxilo que lesam a membrana citoplasmática das bactérias e pela liberação de íons de cálcio que são osteoindutores, estimulando a diferenciação de células progenitoras em células diferenciadas, por aumento da expressão de determinadas proteínas (Atari *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2014; Nozaki *et al.*, 2005). Alguns materiais têm sido utilizados ao longo dos tempos nesta terapêutica, nomeadamente o hidróxido de cálcio e, mais recentemente, os agregados trióxidos minerais.

O hidróxido de cálcio é o agente mais popular para proteções pulpares diretas e indiretas e para a manutenção da vitalidade pulpar, devido à sua capacidade de libertar íons hidroxilo (OH⁻) e de cálcio (Ca²⁺) após a sua dissolução. Este biomaterial é o mais estudado e documentado em vários estudos celulares, animais e clínicos e apresenta resultados satisfatórios com taxas de sucesso que podem ir até aos 80%, pelo que é considerado como *gold standard* (Farhad e Mohammadi, 2005; Poggio *et al.*, 2014; Sangwan *et al.*, 2013). No entanto, tem algumas desvantagens como a fraca adesão à dentina, a alta solubilidade e a instabilidade mecânica e, conseqüentemente, a dissolução do material com formação de pontes dentinárias com múltiplos defeitos em túnel. Além disso, a formação de dentina reparadora induzida por este material, poderá não se dever à sua capacidade bioindutora, mas sim ao mecanismo de defesa do

complexo pulpar perante um material de natureza irritativa. O elevado pH do hidróxido de cálcio causa necrose por coagulação da camada celular superficial com formação de uma camada necrótica na interface tecido pulpar-biomaterial (Akhlaghi e Khademi, 2015; Farhad e Mohammadi, 2005; Gandolfi *et al.*, 2015).

Os agregados trióxidos minerais promovem a proliferação e a diferenciação das células pulpares e demonstram atividade na condutibilidade e na formação de tecido mineralizado, aquando do desenvolvimento da ponte dentinária após uma exposição pulpar. Em comparação com os materiais à base de hidróxido de cálcio, os agregados trióxidos minerais induzem menor inflamação do tecido pulpar e limitam a necrose celular (Lin *et al.*, 2011; Poggio *et al.*, 2014).

Recentemente, têm sido estudadas e desenvolvidas alternativas aos biomateriais anteriores, em especial aos agregados trióxidos minerais, numa tentativa de melhorar algumas das suas características, tais como a manipulação e de tempos de trabalho e de presa. Surgiram, então, os silicatos de cálcio, que se caracterizam por serem hidróxido de cálcio em solução e quando em contato com os tecidos forma-se hidroxiapatite (Akhlaghi e Khademi, 2015; Darvell e Wu, 2011; Song *et al.*, 2015). Alguns estudos referem, também, resultados promissores com moléculas bioativas não específicas para odontoblastos ou para células pulpares, como por exemplo a *odontogenic ameloblast-associated protein*, em proteções pulpares diretas (Ferracane, Cooper e Smith, 2010; Song *et al.*, 2015, 2017; Yang *et al.*, 2010).

Hidróxido de cálcio

Desde a sua introdução em Medicina Dentária por *Hermann* em 1928 na Alemanha, o hidróxido de cálcio tem sido utilizado como agente mineralizante e com efeitos antibacterianos (Farhad e Mohammadi, 2005). A sua aplicação ocorre em diversos procedimentos, nomeadamente, em proteções pulpares diretas e indiretas; na apexogénese e na apexificação; nos tratamentos de reabsorção radicular, de perfurações iatrogénicas radiculares e de fraturas radiculares; em reimplantação dentária e; como medicação intracanal entre consultas de endodontia.

O hidróxido de cálcio é um pó branco sem odor, com a fórmula química Ca(OH)_2 , massa molar de $74,093 \text{ g.mole}^{-1}$ da qual 45,91% corresponde à massa dos íons hidroxilo e 54,09% à massa dos íons cálcio. Tem baixa solubilidade em água ($1,2 \text{ g.L}^{-1}$ a 25°C) que diminui com um aumento da temperatura, uma vez que o coeficiente de dissociação do Ca(OH)_2 é de 0,17, e controla a libertação lenta de íons cálcio e hidroxilo. O componente em pó deste material tem um pH elevado (aproximadamente 12,5-12,8) e é insolúvel em álcool, sendo considerado uma base forte (Farhad e Mohammadi, 2005; Foreman e Barnes, 1990). Quando o Ca(OH)_2 é exposto ao dióxido de carbono (CO_2) ou ao carbonato (CO_3^{2-}) nos tecidos biológicos, a sua dissociação leva à formação de carbonato de cálcio (CaCO_3) e um consumo global de íons Ca^{2+} (Farhad e Mohammadi, 2005; Mohammadi e Dummer, 2011).

O Ca(OH)_2 tem uma baixa resistência à compressão o que limita a sua aplicação clínica quando são necessárias forças de condensação consideráveis na aplicação de alguns materiais restauradores, nomeadamente o amalgama dentário. O Ca(OH)_2 , não é, igualmente, resistente aos ácidos, degradando-se quando estes são aplicados nas técnicas restauradoras adesivas. Existem alguns materiais à base de hidróxido de cálcio que incorporam metacrilatos como iniciadores e aceleradores, o que os torna resistentes à dissolução ácida (Farhad e Mohammadi, 2005; Mohammadi e Dummer, 2011; Song *et al.*, 2017).

A atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 está relacionada com a libertação de íons hidroxilo num ambiente aquoso. Os íons hidroxilo são radicais livres altamente oxidantes, com extrema reatividade com algumas biomoléculas. Essa reatividade é alta e indiscriminada, mas raramente os radicais livres se difundem para longe dos locais onde foram gerados. Os efeitos letais dos íons hidroxilo em células bacterianas devem-se a vários mecanismos, nomeadamente, lesão na membrana citoplasmática bacteriana, desnaturação proteica e lesões no DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid* – DNA). Embora alguns autores sugiram que estes três mecanismos podem ocorrer, é difícil estabelecer a cronologia do aparecimento e/ou qual o principal mecanismo envolvido na morte das células bacterianas após exposição a uma base forte (Farhad e Mohammadi, 2005; Mohammadi e Dummer, 2011). Alguns autores estudaram o efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias e concluíram que os íons hidroxilo do Ca(OH)_2 desenvolvem o seu mecanismo de ação na membrana citoplasmática. Esta membrana é

responsável por funções essenciais no metabolismo, na divisão e no crescimento celular e contribui, nos estádios finais, na formação da parede celular, na biossíntese lipídica, no transporte de eletrões e na fosforilação oxidativa (Lundquist, 2002; Nowicka *et al.*, 2016; Watson *et al.*, 2014). O gradiente de pH da membrana citoplasmática é alterado pela alta concentração de iões hidroxilo decorrentes da ação do hidróxido de cálcio sobre as proteínas da membrana (desnaturação de proteínas). O pH elevado altera a integridade da membrana citoplasmática através da lesão química dos componentes orgânicos e do transporte de nutrientes (Lundquist, 2002). Os iões hidroxilo induzem a peroxidação lipídica, que se traduz na destruição do componente fosfolipídico estrutural da membrana celular e removem os átomos de hidrogénio dos ácidos gordos insaturados da membrana citoplasmática, gerando radicais lipídicos livres (Farhad e Mohammadi, 2005; Mohammadi e Dummer, 2011). Estes radicais livres reagem com o oxigénio, resultando na formação de peróxidos radicais livres que removem mais um átomo de hidrogénio dos ácidos gordos, gerando outro peróxido. Estes peróxidos atuam como radicais livres iniciando uma reação em cadeia que provoca a lesão extensa da membrana citoplasmática. O ajuste do pH intracelular é influenciado por vários processos celulares, tais como o metabolismo celular, as alterações morfológicas, a mobilidade, a adaptação dos transportadores, a polimerização de componentes do citoesqueleto, a ativação da proliferação e do crescimento celular, a condutividade e o transporte através da membrana e o volume celular isosmótico (Chang *et al.*, 2014, 2014; Gandolfi *et al.*, 2015). Assim, muitas funções celulares podem ser afetadas pelo pH, incluindo as enzimas que são essenciais para o metabolismo celular. A alcalinização induz uma quebra das ligações iónicas entre a estrutura terciária das proteínas, perdendo-se a atividade biológica com a consequente desregulação do metabolismo celular (Farhad e Mohammadi, 2005). Alguns autores referem, ainda, que a inativação enzimática bacteriana sob condições extremas de valores de pH durante um longo período de tempo é mesmo irreversível (Mohammadi e Dummer, 2011). Os iões hidroxilo reagem com o DNA bacteriano o que induz o desenrolamento da dupla hélice com perda de genes. Consequentemente, a replicação do DNA é inibida e a atividade celular desorganizada. Os radicais livres podem, também, induzir mutações letais (Farhad e Mohammadi, 2005).

O Ca(OH)_2 quando usado como agente de proteção do tecido pulpar, pode induzir uma barreira calcificada. Devido ao elevado pH pelo hidróxido de cálcio puro, uma camada superficial de necrose por liquefação ocorre na polpa até uma profundidade de 1,5 a 2 mm (Gandolfi *et al.*, 2015; Sangwan *et al.*, 2013; Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000; Watson *et al.*, 2014). Além da formação dessa camada, o Ca(OH)_2 neutraliza, também, as camadas mais profundas, causando uma necrose por coagulação a este nível. Esta necrose por coagulação induz uma resposta inflamatória moderada e, se a zona exposta estiver livre de bactérias, o material que aí foi colocado, pode induzir a formação de um tecido duro (Farhad e Mohammadi, 2005; Sangwan *et al.*, 2013). Abaixo da camada necrótica, que está saturada de íons cálcio, as células dos tecidos pulpares mais profundos diferenciam-se em células do tipo odontoblasto e iniciam a elaboração da matriz, como descrito atrás (Farhad e Mohammadi, 2005). O grupo hidroxilo é considerado o componente mais importante do Ca(OH)_2 , dado favorecer o ambiente alcalino que induz a reparação e a calcificação. O pH alcalino induzido não só neutraliza o ácido láctico dos osteoclastos, evitando a dissolução dos componentes minerais da dentina, mas também pode ativar as fosfatases alcalinas que têm um papel importante na formação de tecidos duros. A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica que atua pela libertação da fosfatase inorgânica a partir dos ésteres de fosfato. Pode separar os ésteres fosfóricos, libertando íons fosfato que então reagem com os íons cálcio da corrente sanguínea, para formar um precipitado, o fosfato de cálcio, na matriz orgânica. Este precipitado é a unidade molecular da hidroxiapatite que está intimamente relacionada com o processo de mineralização. Assim, a fosfatase é essencial no processo de mineralização, pois hidroliza os íons pirofosfato, potentes inibidores deste processo, proporcionando simultaneamente um fosfato inorgânico para a deposição de cristais minerais (Foreman e Barnes, 1990). Além disso, há um aumento da expressão de algumas proteínas, nomeadamente a BMP-2 com formação de nódulos calcificados (Sangwan *et al.*, 2013). É, então, este aumento do pH que cria as condições fisiológicas essenciais para que ocorra a mineralização. A formação de tecido mineralizado após o contato entre o Ca(OH)_2 e o tecido conjuntivo ocorre a partir do 7^o dia até ao 10^o após a aplicação (Mohammadi e Dummer, 2011; Sangwan *et al.*, 2013). No entanto, este pH elevado está longe dos valores ótimos para a sobrevivência dos odontoblastos. Alguns autores referem que após algum tempo com pH

elevado, este começa a diminuir devido ao efeito tampão da dentina, processo que envolve a presença de dadores de prótons. Posteriormente, a formação da matriz dentinária pelos odontoblastos é regulada pela presença de moléculas inibitórias, devido à sua desnaturação pelo ambiente alcalino (Mohammadi e Dummer, 2011; Sangwan *et al.*, 2013).

O pH alcalino pode, também, neutralizar diretamente os ácidos produzidos pelas células com função de reabsorção, prevenindo a progressão das reabsorções radiculares internas. Similarmente, neutraliza o ambiente ácido produzido pela reação inflamatória, que é prejudicial para o processo de cicatrização, e desnatura mediadores inflamatórios, com diminuição da intensidade desta (Sangwan *et al.*, 2013). Os iões cálcio Ca^{2+} desempenham também, funções muito específicas e muito importantes. A contínua dissolução do hidróxido de cálcio produz um microambiente localizado com uma alta concentração de iões Ca^{2+} . Estes, altamente concentrados, formam um gradiente que é capaz de promover a quimiotaxia e a diferenciação das células progenitoras do tecido pulpar (Sangwan *et al.*, 2013). Além desta função, os iões Ca^{2+} têm sido referidos como potentes reguladores de alguns processos celulares como a proliferação, a diferenciação e a mineralização. Alguns estudos referem que o cálcio estimula a síntese de fibronectina pelas células pulpares. O cálcio extracelular também regula a expressão da proteína BMP-2 e da OPN, desempenhando um papel importante na mineralização (Goldberg *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011; Schuurs, Gruyhuysen e Wesselink, 2000). Os iões cálcio podem, também, interferir em algumas funções celulares, através da capacidade para se ligarem a recetores específicos da membrana celular. Outra função do cálcio sugere que este possa interferir na permeabilidade capilar, aumentando concentração de Ca^{2+} extracelular e de pirofosfatase cálcio-dependente, um grupo de enzimas que metabolizam as pirofosfatases inibidoras da mineralização (Sangwan *et al.*, 2013). O processo, na sua globalidade, facilita a progressão da mineralização dos tecidos pulpares como se esquematiza na Figura 5.

Embora de natureza protetora no início, a inflamação no tecido pulpar também pode ter efeitos deletérios. Este tecido está no interior de uma estrutura rígida, sem plasticidade, na qual todo o aumento significativo na pressão pode conduzir à compressão dos vasos e à diminuição do fluxo sanguíneo. Além disso, algumas células pulpares causam reabsorção por secreção de iões hidrogénio, e criam áreas de pH baixo.

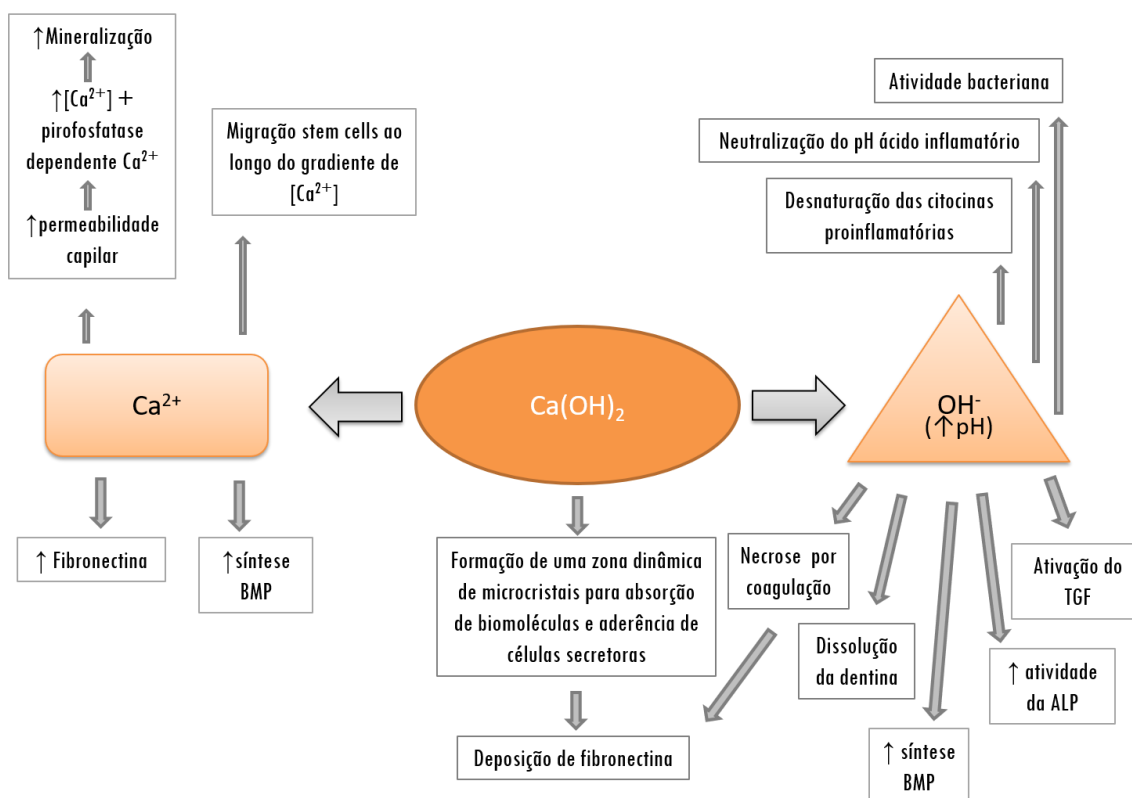


Figura 5: Diagrama dos mecanismos indutores da dentinogênese terciária pelo Ca(OH)_2 . A liberação de moléculas bioativas, seja por estimulação direta de células seja por solubilização da matriz extracelular da dentina, é vital para os efeitos biológicos de Ca(OH)_2 . Tanto os íons cálcio como os íons hidróxido libertados do material regulam os acontecimentos que conduzem à dentinogênese terciária. O cimento contendo Ca(OH)_2 , juntamente com microcristais depositados na sua superfície, fornece um substrato biologicamente ativo para adsorção de biomoléculas e adesão de odontoblastos. Além disso, efeitos não específicos, antimicrobianos e anti-inflamatórios de Ca(OH)_2 na polpa dentária podem auxiliar o processo de mineralização. Adaptado de (Sangwan *et al.*, 2013).

Por um lado, este pH indesejável pode ser neutralizado pelo ambiente alcalino criado por Ca(OH)_2 , evitando assim a destruição dos tecidos. Por outro lado, os mediadores inflamatórios endógenos como a IL-1 α e o TGF- α , desempenham um papel decisivo na regulação da inflamação e na consequente destruição do tecido (Sangwan *et al.*, 2013; Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000). Alguns autores referem que Ca(OH)_2 provoca a desnaturalização destas citocinas pró-inflamatórias, reduzindo-as e exercendo o seu efeito imunomodulador (Sangwan *et al.*, 2013).

A deposição de matriz, e sua consequente mineralização, pode ser suprimida quando os odontoblastos estão na presença de subprodutos bacterianos, tais como lipopolissacarídeos e

ácido lipoteicóico. Estes subprodutos podem causar mais danos ao tecido pulpar, aumentando a reação inflamatória. As propriedades biológicas desses componentes são alteradas pelo Ca(OH)_2 , removendo, assim, o efeito inibitório das células com redução da inflamação e facilitação da dentinogênese. Num estudo *in vitro*, com o objetivo de perceber o papel do Ca(OH)_2 nos processos inflamatórios, de cicatrização e de biomineralização, os autores observaram que induziu a regulação positiva das citocinas pró-inflamatórias até 3 dias. No entanto, ao mesmo tempo, observaram a sobre-expressão da IL-10, conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, o que sinalizou a diminuição subsequente na produção de citocinas pró-inflamatórias após 3 dias. Foi sugerido pelos autores que a sobre-expressão de IL-10 em tecidos em contacto com o Ca(OH)_2 promove um efeito anti-inflamatório (Reyes-Carmona *et al.*, 2011). Outros autores referem que Ca(OH)_2 inibe significativamente a capacidade de aderência do substrato de macrófagos inflamatórios, como os osteoclastos e os dentinoclastos, direcionando os processos para os mecanismos osteogénicos/odontogénicos (Sangwan *et al.*, 2013).

Os materiais com princípio ativo à base de hidróxido de cálcio são dos agentes terapêuticos mais populares para utilização em proteções pulpares diretas. Este pressuposto é devido, como já referido, à sua capacidade de libertação de iões hidroxilo (OH^-) e de iões cálcio (Ca^{2+}) que, uma vez dissolvidos, promovem a diferenciação das células indiferenciadas da polpa em células tipo odontoblasto e, conseqüentemente, a formação de uma barreira dentinária na zona de exposição (Akhlaghi e Khademi, 2015; Steffen e Waes, van, 2009). No entanto, a formação desta dentina reparadora pode não ser devido à sua capacidade bioindutiva, mas como resultado de um mecanismo de defesa do tecido pulpar a um irritante natural, como o hidróxido de cálcio (Poggio *et al.*, 2014). O elevado pH (12,5) causa necrose por liquefação da superfície do tecido pulpar, levando à formação de uma camada necrótica na interface material-polpa dentária (Poggio *et al.*, 2014). Esta camada pode chegar a 1,5mm de profundidade, comprometendo a vascularização desta zona do tecido pulpar e interferindo na coagulação (Sangwan *et al.*, 2013). Esta ação cáustica do Ca(OH)_2 reduz o tamanho polpa subjacente até 0,7 mm (Mohammadi e Dummer, 2011). Numerosos estudos demonstraram a formação de ponte dentinária em cerca de 50-87% dos casos tratados com várias formulações de Ca(OH)_2 (Mohammadi e Dummer, 2011). No entanto, muitos estudos indicam, também, um declínio da taxa de polpas vivas ao longo do

tempo, quando o agente terapêutico da proteção pulpar direta é o hidróxido de cálcio. Numerosos fatores podem contribuir para as baixas taxas de sucesso observadas (Sangwan *et al.*, 2013). A natureza não adesiva deste tipo de cimento, bem como a sua dissolução ao longo do tempo, podem conduzir à microinfiltração e à entrada de bactérias na zona de exposição. A contaminação bacteriana pode, também, ocorrer devido a imperfeições na ponte dentinária, designadas por defeitos em túnel (Farhad e Mohammadi, 2005; Mohammadi e Dummer, 2011; Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000; Song *et al.*, 2017). Esta incapacidade de selagem pode ser considerada uma desvantagem, não esquecendo que o selagem marginal de uma cavidade deve ser requisito do material restaurador, como se observa na Figura 6 (Sangwan *et al.*, 2013). O estado inflamatório pulpar é, também, um dos fatores mais importantes que influenciam as taxas de sucesso e muitas vezes é extremamente difícil de diagnosticar corretamente.

Existem, ainda, outros efeitos secundários indesejáveis do Ca(OH)_2 quando usado em proteções pulpares diretas, nomeadamente, a possibilidade de uma eventual calcificação completa do tecido pulpar do canal radicular e a persistência de uma inflamação induzida, que pode causar uma reabsorção interna.

O Life[®] (Kerr Corporation, Orange, CA, USA), um dos biomateriais utilizado neste estudo, tem como princípio ativo o hidróxido de cálcio. Este tem capacidade de presa própria, é radiopaco e tem um pH extremamente alcalino (entre os 9 e 11). A sua composição e o seu desempenho como material indicado para terapêuticas de proteção do tecido pulpar serão descritos em detalhe no capítulo dos materiais e métodos e na discussão.

Agregados trióxidos minerais

O agregado trióxido mineral (do inglês *mineral trioxide aggregate* - MTA) foi desenvolvido nos anos 90 do século XX (1993) em *Loma Linda University (Califórnia, United States)*, para terapêuticas endodônticas, nomeadamente obturações retrógradas e intervenções cirúrgicas (Torabinejad *et al.*, 1995). Deriva do cimento de Portland (Pérard *et al.*, 2013) e é um produto patenteado e aprovado pela *Federal and Drug Administration (FDA)*, comercializado inicialmente

como ProRoot®MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA) (Okiji e Yoshiba, 2009; Torabinejad *et al.*, 1995; Torabinejad M, 1995).

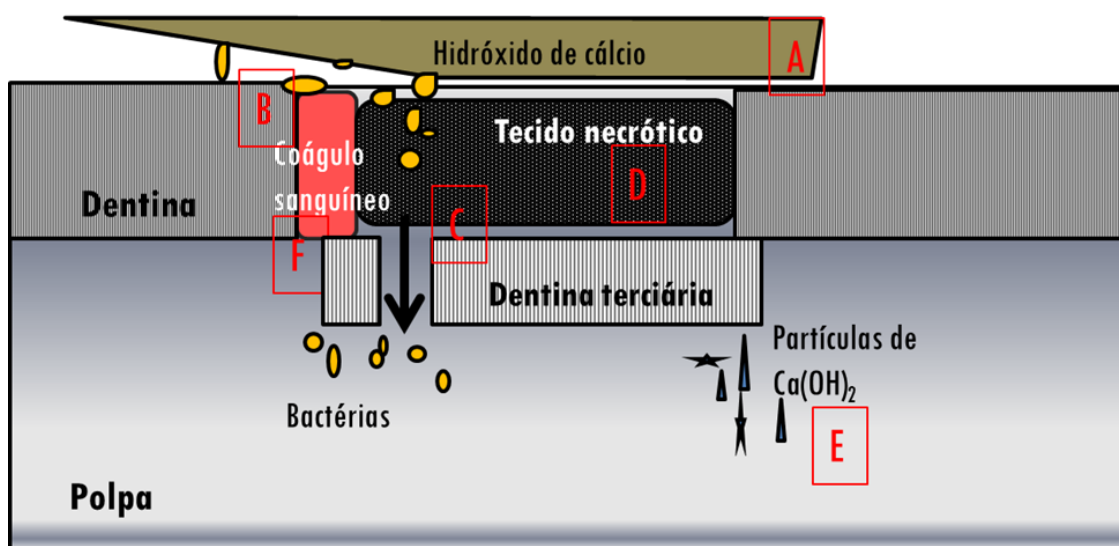


Figura 6: Diagrama esquemático representativo dos diversos fatores responsáveis pelo insucesso das proteções pulpares diretas com hidróxido de cálcio. (A) Não adesão à dentina; (B) Dissolução ao longo do tempo; (C) Defeitos em túnel; (D) Necrose do tecido adjacente, comprometendo a vascularização; (E) Desprendimento de partículas para o interior do tecido pulpar; (F) Coágulo sanguíneo presente entre o material e a polpa. Adaptado de (Sangwan *et al.*, 2013).

Inicialmente existia apenas uma versão cinzenta, mas atualmente existe uma versão branca, introduzida no mercado para colmatar preocupações estéticas (Okiji e Yoshiba, 2009).

O MTA tem sido descrito como sendo osteogênico, biocompatível, indutivo e condutivo da formação de tecido duro. Pela sua elevada alcalinidade tem propriedades bactericida e estimula a formação de tecido tipo cimento, a aderência de células osteoblásticas e a regeneração óssea. Têm sido sugeridas múltiplas aplicações clínicas tais como: proteções pulpares diretas; pulpotomias; obturação apical (*plugs* apicais); apexificação e apexogênese em dentes necróticos imaturos; obturação endodôntica do canal radicular; tratamento de fraturas radiculares horizontais; reparação de defeitos de reabsorções, externas e internas; e reparação de perfurações radiculares e de furca (Darvell e Wu, 2011).

O componente sólido apresenta-se como um pó de finas partículas hidrofílicas, cujos principais compostos são o silicato tricálcico ($3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$), o aluminato tricálcico ($2\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$), o

óxido tricálcico (3CaO), óxido de silicato (SiO_2) e o tetracálcico aluminoférrico ($4\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3.\text{Fe}_2\text{O}_3$). O MTA cinzento é constituído essencialmente por silicato de dicálcico e tricálcico e óxido de bismuto (Bi_2O_3), enquanto que, o MTA branco é composto essencialmente por silicato tricálcico e óxido de bismuto. Quando o pó deste material é misturado com água, formam-se, inicialmente, hidróxido de cálcio e silicato de cálcio hidratado, transformando-se numa pasta relativamente sólida, porosa e pouco cristalizada. O rácio de silicato de cálcio desce devido à formação de um precipitado de cálcio. É este precipitado que produz hidróxido de cálcio, responsável pela alcalinização do MTA após a hidratação. O pH do MTA imediatamente após a mistura é de 10,2, subindo para 12,5 decorridas 3 horas (Camilleri e Pitt Ford, 2006; Darvell e Wu, 2011; Torabinejad *et al.*, 1995; Torabinejad M, 2010). Apesar da origem da formação de hidróxido de cálcio ser controversa, alguns autores referem que está na hidratação do silicato dicálcico e tricálcico, enquanto outros, na hidrogenação do aluminato tricálcico (Parirokh e Torabinejad, 2010). Camilleri e colaboradores analisaram a constituição de diversos agregados trióxidos minerais, nomeadamente as versões branca e cinzenta do ProRoot MTA e o cimento de Portland e concluíram que são semelhantes, havendo apenas a adição de óxido de bismuto nos cimentos ProRoot MTA, presumivelmente para aumentarem a sua radiopacidade (Camilleri e Pitt Ford, 2006). No entanto, alguns autores referem que o óxido de bismuto afeta a precipitação do hidróxido de cálcio após a hidratação. Este fenómeno ocorre porque o óxido de bismuto se dissolve em meio ácido, tipicamente o meio da zona inflamatória onde clinicamente é utilizado. A libertação do óxido de bismuto pode constituir uma diminuição efetiva da biocompatibilidade deste tipo de cimentos (Parirokh e Torabinejad, 2010), já que é considerado um biomaterial ativo e, por isso, com capacidade para interagir com os fluídos tecidulares. No MTA branco não existem compostos férricos e tem, na sua constituição, partículas oito vezes menores do que a versão cinzenta. Estas alterações foram introduzidas com o objetivo de melhorar as suas características estéticas e de manipulação clínica (Camilleri *et al.*, 2005; Camilleri e Pitt Ford, 2006). Assim, alguns autores consideram os agregados trióxidos minerais como cimentos à base de hidróxido de cálcio retido numa matriz de silicato. É esta presença de hidróxido de cálcio que faz com que sejam altamente alcalinos, como já referido (Camilleri *et al.*, 2005; Parirokh e Torabinejad, 2010). Da hidratação do pó do MTA resulta um gel coloidal que solidifica, formando uma

estrutura dura. As características do composto resultante podem ser influenciadas pela proporção pó/líquido; pelo método de mistura, através da incorporação de ar e pressão de condensação; pela humidade e temperatura do ambiente; pelo tipo de MTA e seu veículo, entre outros. Os cimentos à base de MTA são preparados misturando o pó com água esterilizada numa proporção de 3:1. Para o WhiteProRoot® MTA a mistura deve ser de 0,35mL/g e para o MTA Angelus® (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos, SA, Sciarra, Brasil) de 0,28mL/g, devendo ser efetuada sob pressão de uma espátula numa placa de vidro esterilizada em 30 a 60 segundos, obtendo uma consistência de “areia” (Darvell e Wu, 2011). O tempo médio de presa é de 165 ± 5 minutos. O MTA branco tem um tempo de presa mais longo, devido aos níveis baixos de aluminato tricálcico e de enxofre. Este tempo de presa, como foi referido, é influenciado pela humidade e pela temperatura devendo, em condições ideais, decorrer com 37°C e 95% de humidade. Alguns autores referem como tempo de presa, períodos mais longos de 72 horas (Parirokh e Torabinejad, 2010), o que se apresenta como uma das principais desvantagens deste tipo de materiais (Poggio *et al.*, 2014, 2014).

Os estudos efetuados são controversos, não havendo coerência nos diferentes resultados. Alguns autores referem que o MTA branco expande mais do que o cinzento enquanto outros concluem o contrário. No entanto, sabe-se que a composição do meio de mistura exerce uma influência variável sobre a maior ou menor expansão do produto (Parirokh e Torabinejad, 2010; Torabinejad M, 2010).

A maioria dos estudos refere uma baixa ou nula solubilidade do MTA em soro fisiológico. No entanto, a relação pó/líquido pode influenciar significativamente a solubilidade, isto é, quanto maior a relação pó/líquido maior a porosidade e solubilidade do material. Alguns autores referem que o aumento da quantidade de água utilizada para a mistura, aumenta a libertação de cálcio. A adição do óxido de bismuto veio, também, diminuir a solubilidade, já que este componente é insolúvel em água. Alguns autores referem que o MTA branco diminui o seu peso 7 dias após a imersão numa solução fisiológica, porém aumenta-o após 30 dias de imersão. A inicial diminuição de peso é atribuída à libertação de hidróxido de cálcio enquanto o posterior aumento à formação de cristais de apatite na superfície do material. A libertação de iões cálcio é referida por inúmeros autores, especialmente nas primeiras 24 horas e é confirmada pelos

níveis elevados de íons cálcio presentes nos meios de cultura o que, por sua vez, pode influenciar negativamente a proliferação celular (Parirokh e Torabinejad, 2010; Shie *et al.*, 2009).

A resistência dos cimentos de MTA à compressão e à tração, após 24 horas, é significativamente menor do que a de outros materiais dentários. No entanto, após 3 semanas, estes valores já se aproximam. A diferença nos valores de resistência ao longo do tempo deve-se ao facto da taxa de hidratação do silicato dicálcico ser menor do que a do silicato tricálcico. Além de um alargamento temporal para se obterem bons resultados em termos de resistência a ações externas parece, também, fundamental a manutenção de níveis razoáveis de humidade. Este último fator é primordial, pelo menos durante as primeiras 24 horas, para o aumento da resistência à flexão, sendo sugerido por alguns autores a colocação de bolas de algodão hidratado quando se aplica algum destes materiais clinicamente (Parirokh e Torabinejad, 2010).

A resistência à compressão pode diminuir significativamente quando o material é sujeito a uma preparação com ácido ortofosfórico a 37%. Os autores sugerem que esta preparação, que antecede a edificação de uma restauração, apenas deva ser efetuada 96 horas após a colocação do MTA (Watts *et al.*, 2007). Outros fatores podem influenciar a resistência à compressão destes materiais, nomeadamente o tipo de MTA, o líquido de mistura e o seu pH, e a pressão de condensação durante a aplicação clínica. Estes valores estão diminuídos quando o líquido de mistura é a clorhexidina ou uma solução anestésica como a lidocaína com epinefrina 1:100.000. As alterações nas forças de compressão são mais evidentes no MTA cinzento do que na versão branca (Darvell e Wu, 2011). As variações na relação pó/líquido podem diminuir a resistência à compressão (Poggio *et al.*, 2014).

A radiopacidade média para o MTA é o equivalente a uma espessura de 7,17 mm de alumínio. Alguns autores referem que o MTA branco apresenta valores de radiopacidade maiores do que o cinzento (Parirokh e Torabinejad, 2010).

Alguns estudos têm comparado o tamanho das partículas e a sua forma do MTA branco e do MTA cinzento e do cimento de Portland. Os resultados demonstram que as partículas do MTA branco são menores do que as do MTA cinzento e do cimento de Portland, que são semelhantes, e que estão descritas como tendo entre 1 a 10 µm de diâmetro aerodinâmico antes do processo

de hidratação. Esta propriedade é de extrema importância porque todas as características físicas destes materiais são influenciadas pelo tamanho do cristal que se forma. As partículas pequenas aumentam a superfície de contato com o líquido de mistura, tornando os materiais mais resistentes com um menor tempo de presa e, conseqüentemente, mais facilmente manipuláveis (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013; Gandolfi *et al.*, 2014). Outros estudos revelam partículas do MTA de diâmetro aerodinâmico menores que 1,5 μm , o que representa valores menores do que o diâmetro dos túbulos dentinários (Komabayashi e Spångberg, 2008). Estes factos podem influenciar a capacidade de selagem do MTA após a hidratação, com a produção de um selamento hidráulico, embora seja igualmente razoável concluir-se que para que se dê esta ocorrência seja necessário a remoção da *smear-layer*, o que na maioria das vezes não ocorre e está mesmo contraindicado. A porosidade destes materiais está relacionada com a quantidade de água adicionada para efetuar a mistura, com a introdução de bolhas de ar durante este procedimento e até mesmo o pH do meio (Parirokh e Torabinejad, 2010).

A microdureza, tal como outras características físicas é influenciada por diversos fatores, nomeadamente o pH do meio e a quantidade de ar introduzido durante a mistura; a espessura do material e a pressão de condensação exercidas, aquando da sua colocação clínica; a temperatura e a humidade durante o tempo de presa; e a preparação com ácido da superfície do material. Os fatores que possam influenciar o material durante a sua hidratação são preponderantes na formação de cristais cúbicos e de cristais em forma de agulha. O equilíbrio na formação destes dois tipos de cristais é que determina valores maiores ou menores da microdureza. Uma diminuição da microdureza está relacionada com a ausência dos cristais em forma de agulha, o que acontece em meio ácido (Parirokh e Torabinejad, 2010). Alguns estudos referem uma maior microdureza do MTA branco quando comparado com os dois tipos de cimentos de Portland (Danesh *et al.*, 2006). A microdureza do MTA é negativamente afetada por uma menor humidade, por valores de pH baixos, pela presença de um agente quelante ou por pressão de condensação exagerada. Têm sido realizados diversos estudos na tentativa de melhorar as propriedades físicas, químicas e de manipulação dos vários cimentos à base de agregados trióxidos minerais. Novos componentes foram introduzidos e, essencialmente, foi modificada a proporção entre os vários componentes que já faziam parte da sua composição,

e/ou alterado o componente líquido de hidratação (lidocaína, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, nitrato de cálcio). A introdução da lidocaína parece não alterar o pH do material, nem influenciar o tempo de presa, mas diminui a resistência à compressão. O cloreto de cálcio, o cloreto de sódio e o nitrato de cálcio, considerados aceleradores, diminuem drasticamente os tempos de presa. No entanto, alteram o pH dos materiais, aumentando-o, no caso do cloreto de cálcio; ou diminuindo-o, no caso do nitrato de cálcio. Alguns autores referem que a introdução do cloreto de cálcio como acelerador, reduz o tempo de presa resultando no aumento significativo dos valores de pH imediatamente após a mistura. Além disso, há também, um aumento da liberação de íons cálcio nas primeiras 24 horas. Deste facto decorre que, se por um lado os íons cálcio têm um papel importante na viabilidade celular e na produção de tecido dentinário, por outro a concentração destes íons tem que estar dentro de limites específicos, pois pode induzir uma diminuição do crescimento e celular (Parirokh e Torabinejad, 2010).

O efeito antibacteriano e antifúngico do MTA tem sido amplamente estudado, com resultados inconclusivos. Existem estudos que reportam um efeito antimicrobiano sobre determinadas espécies de bactérias e fungos e outros que não revelam este efeito. No entanto, estudos com formulações mais recentes têm revelado um efeito antibacteriano e antifúngico efetivo do material (Parirokh e Torabinejad, 2010). De forma semelhante ao hidróxido de cálcio, o efeito antimicrobiano da MTA está associado ao elevado pH (cerca de 12,5) que resulta da ionização com liberação de íons hidróxido. No entanto, esta atividade é limitada a algumas bactérias facultativas e não têm efeito sobre as anaeróbias estritas, demonstrando um desempenho inferior ao dos cimentos de hidróxido de cálcio. No entanto, mesmo sendo o efeito menor, contribui para a redução da contaminação bacteriana no tecido pulpar (Asgary *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2010; Okiji e Yoshida, 2009; Rahman *et al.*, 2014). Outros autores, substituem o componente líquido (água destilada), por clorhexidina em gel ou líquida. Nestes casos os efeitos antimicrobianos aumentam com alargamento do espectro de ação, nomeadamente sobre os *Enterococcus faecalis*. No entanto, a adição da clorhexidina pode resultar em apoptose celular, diminuição da resistência à compressão do MTA e aumento do tempo de presa, embora estudos em animais, que utilizam a via subcutânea para testes de biocompatibilidade, não demonstrem alterações (Darvell e Wu, 2011; Sumer *et al.*, 2006;

Torabinejad M, 2010). Para além desta alcalinidade bactericida que caracteriza estes materiais, foi demonstrado que estimulam a capacidade adaptativa da resposta imune humoral. Isto é, ocorre um aumento dos anticorpos imunoglobulinas G (IgG) contra os agentes patogénicos endodônticos e uma indução da migração de neutrófilos através da atividade dos mastócitos e macrófagos, em ratinhos (Darvell e Wu, 2011).

Os estudos relativos à adaptação marginal do MTA têm resultados controversos. As condições diversas dos testes efetuados podem influenciar esta diversidade de resultados. No entanto, a maioria refere que este tipo de cimentos de agregados trióxidos minerais têm uma adaptação marginal à estrutura dentária melhor do que outros cimentos à base de óxido de zinco, ionómero de vidro ou o amálgama (Torabinejad M, 2010). Os agregados trióxidos minerais têm a capacidade de produzir espontaneamente precipitados de apatite na presença de fluidos contendo fosfato. Além disso, demonstrou-se a formação de materiais semelhantes à apatite no espaço interfacial MTA-dentina. A apatite é depositada dentro das fibrilas de colágeno e esta camada interfacial composta de apatite é acompanhada da formação de estruturas tipo *tag* que se estendem para os túbulos dentinários. Estas interações entre o tecido dentinário e os produtos produzidos pelo biomaterial promovem a nucleação intrafibrilar deste sobre a dentina (Okiji e Yoshida, 2009). Outros estudos em que foi avaliado o efeito do cloreto de cálcio na capacidade de selagem mostraram que a adição de 10% de cloreto de cálcio aumenta a capacidade selante dos materiais testados (Torabinejad M, 2010). No entanto, foi observada a formação de uma camada interfacial entre o material e o tecido dentinário que pode afetar a sua capacidade de selagem (Reyes-Carmona, Felipe e Felipe, 2009). A adaptação marginal destes materiais é fundamental na área da endodontia, já que o sucesso de uma terapêutica endodôntica depende muito da capacidade selante dos materiais utilizados para obturar o sistema de canais. No caso de terapêuticas do âmbito da dentisteria operatória, com o objetivo de indução da dentinogénese em áreas de exposição do tecido pulpar, esta característica reveste-se de menor importância.

Diversos estudos, incluindo uma meta-análise demonstram a maior biocompatibilidade do MTA em relação a outros materiais amplamente estudados, nomeadamente os cimentos de óxido de zinco e o amálgama (Fernández-Yáñez Sánchez, Leco-Berrocal e Martínez-González,

2008; Okiji e Yoshiba, 2009; Torabinejad e Parirokh, 2010). O MTA provoca, quando em contato direto com os tecidos, necrose limitada do tecido pulpar, com um efeito menos cáustico e menor inflamação pulpar, quando comparado com os cimentos de hidróxido de cálcio. Assim, facilita a proliferação/diferenciação das células pulpares, exibindo uma atividade indutora da formação de tecido calcificado com capacidade para estimular a formação de uma ponte dentinária (Okiji e Yoshiba, 2009; Poggio *et al.*, 2014). Estudos celulares e animais não mostraram qualquer alteração genética com os agregados trióxidos minerais (Darvell e Wu, 2011). O MTA tem na sua constituição uma pequena quantidade de arsênico, o que gera alguma preocupação sobre a sua utilização clínica. No entanto, alguns estudos demonstram que a liberação de arsênico III, forma mais tóxica deste metal, ocorre em concentrações muito baixas, sendo seguro para utilização em humanos (Gonçalves *et al.*, 2010).

Os cimentos à base de agregados trióxidos minerais são materiais bioativos que têm a capacidade de criar um ambiente que potencia a regeneração e a cicatrização tecidular. Quando o MTA é aplicado em contato direto com os tecidos forma hidróxido de cálcio que libera íons cálcio, fundamentais para a adesão e a proliferação celular. Adicionalmente cria um ambiente antibacteriano com o aumento do pH (alcalinizando o meio), modula a produção de citocinas, induz a diferenciação e a migração de células capazes de produzir tecido dentinário ou ósseo e forma hidroxiapatite ou carbonatoapatite na sua superfície, induzindo uma selagem biológica (Camilleri e Pitt Ford, 2006). A hidroxiapatite pode liberar íons cálcio e fósforo continuamente, contribuindo para o metabolismo dos tecidos duros, para a selagem marginal com o tecido dentinário e para a regeneração e a remineralização dos tecidos duros (Asgary *et al.*, 2008; Parirokh e Torabinejad, 2010). O MTA apresenta, também, os valores mais baixos de citotoxicidade (Okiji e Yoshiba, 2009). De facto, em cultura celular, o MTA libera significativamente mais íons cálcio do que um cimento de hidróxido de cálcio e esta contínua liberação fornece uma quantidade ótima de cálcio para a proliferação celular. Alguns autores referem que o MTA induz um fenótipo osteogénico que reflete uma regulação mais eficaz da fosfatase alcalina, osteonectina e osteopontina. Aumenta, também, a quantidade produzida de BMP-2, de colagénio do tipo I e de OCN (Torabinejad M, 2010). Estudos em culturas celulares com MTA mostram que a resposta celular depende de muitos fatores, nomeadamente, da linha

celular e da duração do estudo, da utilização de material fresco ou com presa, da frequência com que o meio é substituído, da utilização de técnicas de contato direto ou de extratos, e da concentração do material no meio de cultura. Com base em diversos estudos, podemos concluir que o MTA não é citotóxico, genotóxico, mutagênico, neurotóxico e não produz efeitos secundários na microcirculação, apesar de poder influenciar a constrição dos vasos sanguíneos (Accorinte *et al.*, 2008; Jafarnia *et al.*, 2009; Torabinejad M, 2010). Como já foi referido, têm sido efetuadas diversas tentativas para modificar os componentes do pó ou substituir a água destilada por outro componente líquido para obter a mistura mais adequada. O principal argumento para as diversas combinações incluem a possibilidade de aumentar a atividade antibacteriana, de diminuir o tempo de presa e de melhorar as características de manipulação do material. No entanto, alguns estudos demonstram que a inclusão de clorhexidina na mistura aumenta a apoptose celular (Torabinejad M, 2010). Por outro lado a utilização de fosfato disódico não parece alterar a viabilidade celular após um e 7 dias (Ding *et al.*, 2008). A maioria dos estudos *in vitro* confirma o MTA como um material regulador de citocinas e de moléculas de sinalização, nomeadamente diversas interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18), a OCN, a ALP, a DSP, a OPN, a BMP-2 e o colagénio do tipo I (Camilleri e Pitt Ford, 2006; Roberts *et al.*, 2008; Torabinejad e Pariookh, 2010). Em geral, estudos *in vitro* indicam que o MTA é biocompatível e possui a capacidade de estimular as células formadoras de tecidos duros para induzir a formação da matriz e a sua mineralização (Okiji e Yoshiba, 2009).

A biocompatibilidade do MTA foi avaliada em estudos *in vivo* com animais onde se observou a reação tecidual após a colocação de implantes subcutâneos e intra-ósseos dos materiais. A implantação subcutânea, em ratos, demonstrou que o MTA produz, inicialmente, reações severas com necrose por coagulação e calcificação distrófica. As reações a implantes intra-ósseos são menos intensas, ocorrendo osteogénese com formação de tecido duro e reações inflamatórias mínimas. Estudos em tecidos periapicais demonstraram uma resposta periapical favorável com a formação de um tecido semelhante ao cimento sobre o MTA (Camilleri e Pitt Ford, 2006). Estudos em macacos e em cães, demonstram que a maioria das proteções pulpares efetuadas com MTA revelam polpas dentárias livres de inflamação, com formação de uma ponte dentinária após 5 meses. Estes resultados são diferentes dos apresentados com outros

materiais com os quais foram comparados, nomeadamente os cimentos de hidróxido de cálcio, os quais desencadeiam sinais inflamatórios acentuados e a formação de uma ponte dentinária significativamente menos calcificada (Mente *et al.*, 2010). Outros estudos apresentam resultados da formação da ponte dentinária 7 dias após o tratamento (Camilleri e Pitt Ford, 2006; Okiji e Yoshida, 2009; Parirokh e Torabinejad, 2010; Steffen e Waes, van, 2009). Trabalhos em molares de rato, compararam as proteínas morfogenéticas ósseas, as BMP-7, e o MTA como protetores pulpares diretos. A imunohistoquímica demonstrou a presença da DSP na zona de formação de dentina terciária, com resultados mais evidentes com a utilização do MTA quando comparado com as proteínas morfogenéticas, mostrando o primeiro a formação de uma ponte dentinária estruturalmente mais homogênea do que o segundo biomaterial (Parirokh e Torabinejad, 2010).

Estudos clínicos demonstram que proteções pulpares diretas realizadas com MTA levam à formação de uma ponte dentinária em menor tempo e mais espessa do que quando é utilizado o hidróxido de cálcio. Além disso, a inflamação do tecido pulpar é quase nula, associada a uma camada odontoblástica mais regular junto à zona da lesão (Roberts *et al.*, 2008). Estudos com controlo efetuado aos 6 meses, demonstraram não haver diferenças estatisticamente significativas na preservação da vitalidade pulpar quando são utilizados o hidróxido de cálcio ou os agregados trióxidos minerais (Iwamoto *et al.*, 2006).

Apesar das inúmeras vantagens já referidas, os cimentos à base de agregados trióxidos minerais têm alguns inconvenientes. Um dos principais é a descoloração potencial da estrutura dentária, sendo o ferro e o manganésio os presumíveis responsáveis. A presença de elementos tóxicos na composição do material também é uma preocupação, nomeadamente a presença de arsénico, tal como foi referido. No entanto, a presença de óxidos férricos e o seu efeito estabilizante sobre o arsénico, a insolubilidade do MTA e a sua utilização clínica em quantidades muito pequenas, deve limitar a libertação de arsénico nos tecidos e fluídos, diminuindo o risco de toxicidade (Parirokh e Torabinejad, 2010). Outras desvantagens prendem-se com a sua utilização clínica, nomeadamente algumas dificuldades de manipulação aquando da sua colocação na estrutura dentária; o seu longo período de presa que dificulta a progressão das terapêuticas; e a dificuldade de remoção após a tomada de presa, consequência da não

existência de um solvente para este material (Parirokh e Torabinejad, 2010). Apresenta, ainda, elevado custo, o que diminui consideravelmente a sua aplicação clínica de rotina.

Concluindo, o MTA tem diversas propriedades físicas benéficas relativamente ao hidróxido de cálcio, incluindo uma boa capacidade de selagem, um menor grau de dissolução e uma maior estabilidade estrutural. O MTA também tem a capacidade de interagir com os fluidos tecidulares contendo fosfato para formar espontaneamente precipitados de apatite, o que não só explica a sua biocompatibilidade e bioatividade, mas pode também contribuir para sua capacidade de selagem. Assim, a capacidade do MTA para induzir a reparação do tecido duro, adjacente aos tecidos pulparexpostos, depende maioritariamente da sua capacidade para criar um ambiente local favorável, no qual a capacidade intrínseca de cicatrização da polpa dentária não é deteriorada (Okiji e Yoshida, 2009). Com base na maioria dos estudos celulares e histológicos já referidos, o MTA parece superior aos materiais à base de hidróxido de cálcio quanto à sua capacidade de estimular a dentinogénese reparadora, quando aplicado em polpas saudáveis expostas mecanicamente. Assim, o MTA é considerado como *gold-standard* para proteções do tecido pulpar exposto (Akhlaghi e Khademi, 2015; Chang *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016). A biocompatibilidade, a osteogenicidade e a hidrofília dos agregados trióxidos minerais tornam-no num material ideal para obturações radiculares retrógradas após cirurgia apical; perfurações radiculares; terapêuticas pulparexpostas incluindo a proteção pulpar direta; a pulpotomia em dentes imaturos (apexogénese), assim como a aplicação como *plug* apical em dentes imaturos com polpas necróticas (apexificação) (Eid *et al.*, 2013; Okiji e Yoshida, 2009).

Silicatos tricálcicos

Os cimentos de aluminato de cálcio hidráulico para utilização biomédica são modificações dos cimentos de alto teor de alumina, usados em revestimento refratário de fornos ou em algumas aplicações na engenharia civil. Foram desenvolvidos no início do século XX e classificados como tendo uma durabilidade química maior que os cimentos de Portland. A sua aplicação não biomédica estende-se a áreas onde há necessidade de materiais altamente resistentes a ácidos e à corrosão (Camilleri, 2013). Esta sua característica torna-os úteis quando

aplicado à Medicina em tecidos biológicos, altamente infecciosos, onde o pH baixa significativamente. Na Medicina Dentária, este biomaterial inerte, biocompatível e altamente resistente é utilizado com sucesso em implantologia como material de regeneração óssea, em dentisteria operatória incorporado em alguns materiais restauradores diretos e em cimentos de ionômero de vidro e em endodontia, associado a um radiopacificador, como cimento endodôntico (Eid *et al.*, 2013). O silicato tricálcico é bioativo e, quando hidratado, transforma-se em silicato de cálcio hidratado (C-S-H) e hidróxido de cálcio reagindo na presença de fluídos fisiológicos, com produção de hidroxiapatite que se deposita principalmente na superfície da pasta de silicato tricálcico. Esta é biocompatível e induz a diferenciação das células pulpares à semelhança do que ocorre com o hidróxido de cálcio (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013). Estes materiais baseados em aluminossilicato de cálcio são cada vez mais utilizados nos últimos anos, devido à sua semelhança com os agregados trióxidos minerais. Dentro deste grupo o mais estudado e popular é o Biodentine™ (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France), comercializado desde 2009, que também deriva do cimento de Portland e que foi concebido como material substituto ou reparador de dentina (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014; Pérard *et al.*, 2013). No entanto, existem outros como o Bioaggregate® (Innovative Bioceramix Inc. Vancouver, Canada) com composição semelhante ao Biodentine™, mas com um material radiopaco diferente, o óxido de tântalo (Ta) (Grech, Mallia e Camilleri, 2013). O Biodentine™ tem várias aplicações quer na área da endodontia, quer na de dentisteria operatória. Em endodontia pode ser utilizado na reparação de perfurações ou reabsorções, na apexificação e como material de obturação em condições específicas. Em dentisteria operatória pode ser utilizado como substituto do tecido dentinário ou em terapêuticas indutoras de dentinogênese nas proteções pulpares diretas. Este material é semelhante tecnologicamente aos agregados trióxidos minerais com algumas propriedades melhoradas, especialmente as físicas, como o período de presa e o potencial de descoloração (Rathinam *et al.*, 2015) assim como a manipulação clínica.

O Biodentine™ é constituído por dois componentes, um pó sólido e um líquido. O componente sólido é composto por silicato tricálcico (componente principal), silicato dicálcico (segundo componente), óxido de cálcio, carbonato de cálcio e óxido de zircónio (Camilleri, 2013; Nowicka *et al.*, 2013). Os silicatos tri e dicálcico são os compostos principais e o óxido de zircónio

serve como material radiopaco. Por outro lado, o componente líquido contém cloreto de cálcio como acelerador e um polímero hidrossolúvel que serve como agente redutor, para manter uma boa fluidez com uma proporção baixa líquido/sólido (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013). O carbonato de cálcio caracteriza-se por ser um componente com partículas de grandes dimensões, quando comparadas com as do silicato tricálcico, que se rodeiam de componentes hidratados, atuando como local de nucleação para outras partículas, para formar uma microestrutura. Atua como local de nucleação para o complexo silicato de cálcio hidratado (C-S-H), com redução do período de indução. Como consequência desta redução, o tempo de presa é reduzido e inicia-se em poucos minutos (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013). Esta é uma característica única deste material, cuja presa inicial ocorre aos 9 a 12 minutos (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013) e aos 45 minutos se encontra na fase final (Grech, Mallia e Camilleri, 2013). Por outro lado, este material tem valores de impedância estáveis apenas após 14 dias. Este facto deve-se sobretudo à sua alta porosidade, com grande capacidade de troca de iões entre o material e o meio (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014).

Este material caracteriza-se pela libertação de cálcio quando em solução, já que os silicatos tricálcicos se definem como uma fonte de hidroxiapatite quando estão em contacto com o fluido tecidual sintético, como se pode observar pela leitura das reações químicas representadas na Figura 7 (Niu *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2015; Saghiri *et al.*, 2017).

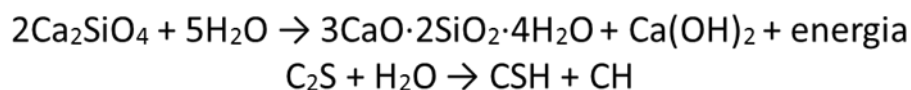
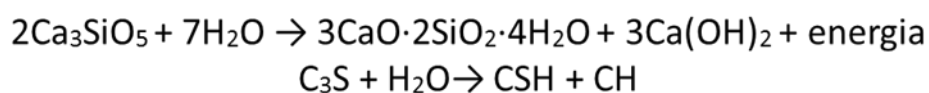


Figura 7: Reações químicas do biomaterial Biodentine™ durante o tempo de presa. Ca_3SiO_5 ou C_3S representa o silicato tricálcico, também designado por alita; Ca_2SiO_4 ou C_2S representa o silicato bicálcico também designado por belita; H_2O representa a água; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CH representa o hidróxido de cálcio; CSH representa o sulfato de cálcio hidratado.

Estudos sobre o mecanismo de ação do Biodentine™ demonstram a formação de estruturas tipo *tag* ao lado de uma camada interfacial denominada "zona de infiltração mineral", onde o efeito alcalino dos produtos de hidratação do cimento de silicato tricálcico degrada o colagénio da dentina interfacial. Esta degradação leva à formação de uma estrutura porosa que facilita a permeabilização de grandes concentrações de iões Ca^{2+} , OH^- e CO_3^{2-} , levando a uma maior mineralização nesta região (Rocha *et al.*, 2015; Watson *et al.*, 2014). Tanto o cálcio como os iões hidroxilo libertados do material regulam os acontecimentos que conduzem à dentinogénese terciária.

A resistência à compressão é uma característica importante para a escolha de um material numa terapêutica de proteção pulpar direta, já que é essencial que este consiga resistir às forças mastigatórias a que vai estar sujeito. Os dados da ficha técnica do Biodentine™ referem-no como tendo a capacidade de melhorar ao longo do tempo os seus valores de resistência à força compressiva aproximando-se dos valores do tecido dentinário (Septodont Research Department, 2009). Alguns autores referem que este cimento demonstra valores de resistência à compressão superiores a outros materiais similares e atribuem este desempenho à diminuição da proporção água/cimento por adição do polímero hidrossolúvel (Camilleri, 2013). A microdureza foi também avaliada e mostrou valores mais elevados quando comparados com outros cimentos de ionómero de vidro não condicionados com ácidos. No entanto, os valores de microdureza são semelhantes quando os materiais são sujeitos à ação de ácidos (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014).

As forças de adesão entre o Biodentine™ e sistemas de adesão dentinária diferentes, têm resultados semelhantes quer sejam adesivos *total etch*, quer sejam adesivos *self-etch* (Koubi *et al.*, 2013). Relativamente à resistência da adesão à estrutura dentária, o Biodentine™ tem resultados melhores, quando comparado com o ProRoot®MTA, mesmo quando há contaminação sanguínea no decorrer da colocação do biomaterial, independentemente do tempo de presa. Na adesão à estrutura dentinária, a remoção da *smear-layer* reduz significativamente a força de adesão, essencialmente devido à incapacidade das partículas de cimento de silicato de cálcio conseguirem penetrar nos túbulos dentinários, devido ao tamanho das partículas. A camada de *smear-layer* é importante na formação da interface adesiva, podendo estar envolvida na

interação mineral entre os componentes do Biodentine™ e o tecido dentinário (Odabaş, Bani e Tirali, 2013). Alguns autores não encontraram evidências de troca iônica, pelo que concluíram que a excelente adaptabilidade deste material à dentina subjacente depende principalmente da adesão micromecânica (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014).

O grau de porosidade desempenha um papel muito importante no sucesso global dos tratamentos realizados com estes materiais, já que é o fator crítico que determina a maior ou menor microinfiltração. A porosidade tem impacto sobre numerosos fatores, nomeadamente a absorção, a permeabilidade, a força de adesão e a densidade do biomaterial (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013). Alguns autores sugerem que em proteções pulpares indiretas, como o material é geralmente mantido seco, a utilização de Biodentine™ pode representar um problema em termos de porosidade e resultar na formação de lacunas na interface, com consequente passagem bacteriana, já que apresenta maiores valores de porosidade a seco do que em meio húmido (Koubi *et al.*, 2013; Martens, Rajasekharan e Cauwels, 2015). Outros referem que não encontraram diferenças significativas na porosidade, na microinfiltração, na solubilidade e nas microfracturas entre os novos cimentos contendo silicato de cálcio e o *gold standard*, o MTA, em contexto clínico, (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014).

No Biodentine™, a radiopacidade é dada pelo óxido de zircónio, ao contrário de outros materiais, como os agregados trióxidos minerais, que utilizam o óxido de bismuto. A razão da escolha tem por base os resultados de alguns estudos que mostram que o óxido de zircónio possui características biocompatíveis e é indicado como um material bioinerte, com propriedades mecânicas e de resistência à corrosão favoráveis. A ISO 6876:2001 estabeleceu que este tipo de materiais deve ter uma radiopacidade que corresponda a, pelo menos 3 mm de alumínio (Al), valor maior que a da dentina e a do tecido ósseo. Estudos com vários silicatos tricálcicos demonstram valores maiores que 3 mm de Al (Camilleri, 2013; Grech, Mallia e Camilleri, 2013). No entanto, alguns autores referem que estes valores poderão ser mais baixos, na dependência das condições de experimentação e dos períodos de preservação, entre outros fatores (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014).

Grech e colaboradores demonstraram valores de solubilidade negativa para vários silicatos tricálcicos e para o Biodentine™, num estudo em que avaliaram várias propriedades físicas dos

materiais. Os autores atribuem este resultado à deposição de substâncias, como hidroxiapatite, na superfície do material quando em contato com os fluidos tecidulares. Esta propriedade é bastante favorável, uma vez que indica que o material não perde partículas da sua matriz, o que resultaria numa instabilidade dimensional (Grech, Mallia e Camilleri, 2013).

Os biomateriais, seja o hidróxido de cálcio, sejam os agregados trióxidos minerais ou os silicatos tricálcicos, têm efeitos sobre a resistência à flexão do tecido dentinário. A questão fundamental na influência desta propriedade prende-se com a libertação de hidróxido de cálcio por hidrólise, na superfície dos componentes de silicato de cálcio. Por outro lado, também foi determinado que o contacto prolongado da dentina radicular com hidróxido de cálcio, bem como com os agregados trióxidos minerais tem efeitos prejudiciais sobre a resistência da dentina radicular, diminuindo-a. Portanto, é fundamental considerar os efeitos do hidróxido de cálcio liberado sobre a matriz dentinária de colágeno, especialmente em procedimentos onde há um contacto permanente da dentina com materiais à base de silicato de cálcio. Alguns autores avaliaram a possibilidade do contacto prolongado da dentina com materiais à base de silicato de cálcio ter alguma influência sobre as suas propriedades mecânicas. De acordo com os resultados do seu estudo, em que compararam Biodentine™ com MTAPlus® (Avalon Biomed, Inc, Houston, TX, USA), concluíram que ambos os materiais alteraram a resistência à flexão e a dureza do tecido dentinário após envelhecimento em 100% de humidade relativa. Sugeriram que, embora a capacidade da dentina para suportar impactos externos e resistência a forças externas possa não ser afetada de uma forma crítica quando utilizado em camadas muito finas, deve ser ponderada cautelosamente a sua utilização como substituto total do tecido dentinário (Sawyer *et al.*, 2012).

Quando utilizado como base ou *liner*, a microinfiltração do Biodentine™ é importante porque pode desencadear sensibilidade pós-operatória e cáries secundárias ou, até mesmo, patologia pulpar grave, com conseqüente insucesso do tratamento. Alguns autores referem que os silicatos tricálcicos têm uma boa integridade marginal, explicada pela sua capacidade para formar cristais de hidroxiapatite na superfície. Estes cristais têm o potencial de aumentar a capacidade de selagem, especialmente quando formados na interface do biomaterial com as paredes dentinárias. A nanoestrutura e a formação do gel de silicato de cálcio é um dos fatores

que influencia a selagem, pois essa textura permite que o material se adapte melhor na superfície da dentina. Durante o tempo de presa existe, também, uma ligeira expansão destes materiais, o que contribui para a sua melhor adaptação (Camilleri, 2013; Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013; Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014). Outros autores referem resultados contrários, com valores de microinfiltração muito elevados. No entanto, estas discrepâncias podem ser devidas à metodologia utilizada para a detecção da microinfiltração, sendo necessário outros estudos (Camilleri, Sorrentino e Damidot, 2013). A resistência à lavagem de um material é definida como a capacidade de resistência da pasta de cimento recém-preparada em se desintegrar por contacto precoce com fluidos, tais como sangue ou outros. Os resultados do estudo sobre estas características não se revelaram favoráveis para o Biodentine™, uma vez que o material mostrou uma alta degradação. Os autores atribuíram este resultado ao efeito surfactante do polímero solúvel em água, adicionado ao material, para reduzir a sua proporção água/cimento (Grech, Mallia e Camilleri, 2013). Outros autores referem que o Biodentine™ exhibe microinfiltração e erosão da superfície quando tratado com ácido ortofosfórico a 37%, utilizado frequentemente nas técnicas adesivas. Este procedimento deverá ser evitado (Camilleri, 2014).

A biocompatibilidade de um material dentário é um factor fundamental que deve ser tido em consideração e, de uma forma especial, quando é utilizado nas terapêuticas de preservação da vitalidade pulpar através de proteções pulpares diretas. Durante estes procedimentos, o material está em contacto direto com o tecido pulpar e tem o potencial de afetar a viabilidade das células pulpares. Por conseguinte, é essencial que se evitem materiais tóxicos e se prefiram materiais que promovam a reparação ou que sejam biologicamente neutros. Vários estudos têm sido realizados para determinar a biocompatibilidade dos silicatos tricálcicos, nomeadamente o tipo de morte celular que ocorre, a secreção de biomoléculas que promovam a proliferação e a diferenciação celular e a mineralização das estruturas de contacto. Verificou-se que o Biodentine™ aumenta significativamente a secreção de TGF- β 1 a partir de células da polpa, factor de crescimento com um papel importante na angiogénese, no recrutamento de células progenitoras, na diferenciação celular e na mineralização (Chang *et al.*, 2014, 2014; Fonseca, da *et al.*, 2016; Martens, Rajasekharan e Cauwels, 2015; Rathinam *et al.*, 2015). Estudos de avaliação da superfície dos biomateriais concluíram igualmente que, apesar da topografia de

superfície irregular e cristalina dos silicatos tricálcicos e dos agregados trióxidos minerais, em comparação com a textura superficial lisa do ionômero de vidro, a aderência e o crescimento das células eram mais favoráveis nos biomateriais referidos em comparação com o ionômero de vidro (Malkondu, Kazandag e Kazazoglu, 2014).

Um dos primeiros estudos a demonstrar a indução de reparação dentinária eficaz foi o de Tran e colaboradores, em que biomaterial foi aplicado diretamente em polpas de ratos expostas mecanicamente. No seu estudo, o Biodentine™ foi comparado a um agregado trióxido mineral e ao hidróxido de cálcio, avaliando a formação de uma ponte dentinária reparadora (Tran *et al.*, 2012). Os autores observaram que a estrutura induzida por Ca(OH)_2 continha vários defeitos de túnel. Estas zonas são áreas indesejáveis, porque facilitam a migração dos microrganismos para o tecido pulpar. Pelo contrário, a formação da ponte dentinária induzida pelo Biodentine™ mostrou uma camada bem definida no local da lesão, ao contrário da formada pelo hidróxido de cálcio que exibia uma estrutura em expansão para a câmara pulpar (Koubi *et al.*, 2013; Poggio *et al.*, 2014, 2014; Rathinam *et al.*, 2015; Tziafa *et al.*, 2015). Além disso, as células responsáveis pela mineralização da estrutura exibiam uma elevada expressão de DSP e de OPN que são proteínas chave na regulação da formação da dentina reparadora (Tran *et al.*, 2012). Num estudo clínico realizado em molares extraídos por razões ortodônticas, os autores demonstraram que o Biodentine™ teve uma eficácia semelhante aos agregados trióxidos minerais em ambiente clínico e, pode ser considerado como uma alternativa para procedimentos de proteção do tecido pulpar após uma exposição do mesmo. A formação completa da ponte dentinária e a ausência de resposta inflamatória foram, também, observadas (Chang *et al.*, 2014, 2014, Nowicka *et al.*, 2013, 2015).

Outros materiais e ou terapêuticas

Alguns estudos referem que a utilização de ultrassons de baixa intensidade aumenta a expressão de fator de crescimento vascular endotelial (do inglês *vascular endothelial growth factor*- VEGF) e influencia a atividade dos odontoblastos e, conseqüentemente, a reparação da dentina pela modulação da produção de fatores de crescimento endógeno no complexo dentino-

pulpar. Alguns autores referem, também, que há um aumento da proliferação, da diferenciação e a produção de uma matriz mineralizada das células tipo-odontoblasto (Paranjpe *et al.*, 2011; Scheven *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2013). Esta técnica é referenciada como uma possível terapêutica para promover a reparação dentinária e, conseqüentemente, a preservação da vitalidade pulpar. No entanto não existe evidência científica para que seja aplicado clinicamente (Man *et al.*, 2012; Scheven *et al.*, 2009).

Os sistemas de adesão dentinária podem provocar lesão do tecido pulpar devido à corrosão induzida pelo ácido ou por componentes acídicos, à toxicidade dos outros componentes, nomeadamente os monómeros dos metacrilatos, à microinfiltração decorrente da contração de polimerização e da dentina parcialmente desmineralizada penetrada pela resina (nanofiltração) e à hipersensibilização e aumento de temperatura durante a polimerização. Separar os efeitos desses factores, de modo a avaliar os efeitos sinérgicos que podem ocorrer, é difícil, senão impossível. Alguns autores referem que os ácidos parecem não danificar permanentemente a pulpa exposta, com a possível exceção do ácido ortofosfórico a 37% (Ramos, 2008; Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000). Outros referem que os monómeros, entre os quais as moléculas relativamente pequenas de trietileno glicil metacrilato (do inglês *triethylene glycol dimethacrylate* - TEGDMA) e hidroxietil metacrilato (do inglês *hydroxyethyl methacrylate* - HEMA) são citotóxicos em culturas celulares e afetam o metabolismo destas (Pameijer e Stanley, 1998). Os estudos demonstraram, sistematicamente, que existe uma ausência na formação da ponte dentinária (Pameijer e Stanley, 1998; Smith *et al.*, 2012, 2012). Os efeitos sinérgicos dos diversos componentes dos sistemas adesivos sobre as células, raramente são estudados, mas provavelmente existem. No entanto, o tecido pulpar reveste-se de maior complexidade do que uma cultura de células e as concentrações dos componentes diminuem por diluição e transporte (Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000). A microinfiltração é um fator importante para o prognóstico de uma proteção pulpar direta, sendo que o seu grau é determinado em grande parte pela técnica e material utilizado para a restauração da cavidade e, pelas capacidades clínicas do operador (Ramos, 2008). Alguns estudos referem que a presença de bactérias na cavidade não parece estar relacionada com a severidade da resposta pulpar (Pameijer e Stanley, 1998). Por outro lado, outros autores referem taxas de sucesso mais elevadas com o hidróxido

de cálcio do que com os sistemas de adesão dentinária, contraindicando esta técnica (Damaschke *et al.*, 2010; Pameijer e Stanley, 1998; Yasuda *et al.*, 2008).

O Emdogain® (Straumann Institute, Basel, Switzerland) é um material derivado da matriz do esmalte (do inglês *enamel matrix derivative* - EMD), extraído da camada de Hertwig de dentes porcinos na sua fase de desenvolvimento. Originalmente desenvolvido para promover a regeneração periodontal, tem sido proposto em vários estudos recentes como um potencial material de proteção pulpar (Fransson, Petersson e Davies, 2011; Olsson *et al.*, 2005; Rathe *et al.*, 2009). As amelogeninas, que são os principais componentes do EMD, podem mimetizar interações epitélio-mesenquimatosas desencadeando a libertação de vários fatores de crescimento e de citocinas, tais como a BMP e o TGF- β que, por sua vez, promovem a diferenciação de células progenitoras mesenquimatosas em células tipo-odontoblastos. Além disso, o EMD pode, também, aumentar a mineralização da dentina através da regulação das células tipo-odontoblasto (Olsson *et al.*, 2005). Em terapêuticas de proteção pulpar, o EMD pode facilitar a formação de uma barreira de dentina reparadora mais espessa quando comparada com o hidróxido de cálcio, como foi demonstrado em vários estudos *in vivo* com animais (Rathva, 2011). Os estudos clínicos ainda não demonstram resultados tão promissores com sintomatologia pós-operatória mais evidente associada a inflamação pulpar. Serão necessários mais estudos no futuro (Song *et al.*, 2017).

A fosfoproteína da dentina e a sialoproteína da dentina são moléculas bioativas que estão aprisionadas na dentina durante a fase de deposição e são protegidas de qualquer degradação. Na solubilização da matriz dentinária, estas moléculas são libertadas na zona imediata e afetam os processos em curso (Ferracane, Cooper e Smith, 2010; Smith *et al.*, 2012). As moléculas reguladoras sequestradas podem ser libertadas da matriz dentinária na interação desta com vários agentes. A desmineralização ácida que ocorre durante o processo de cárie pode causar a sua libertação e iniciar um processo auto-protetor da polpa por deposição de dentina. É provável que os ácidos aplicados externamente durante vários procedimentos terapêuticos, ou outros agentes como o EDTA, o hidróxido de cálcio, os silicatos tricálcicos e os agregados trióxidos possam ter efeitos idênticos (Ferracane, Cooper e Smith, 2010). Desde o início do século, materiais bioativos têm sido propostos como alternativas para as terapêuticas de proteção dos

tecidos pulpaes. As biomoléculas referidas atrás como BMPs, fator de crescimento tipo insulina 1, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, TGF, fator de crescimento derivado de plaquetas e proteínas derivadas da matriz, como a DSP, podem estimular a formação de dentina reparadora (Goldberg *et al.*, 2003). No entanto, o tipo de transportador e a dose aplicada precisam de ser avaliados em estudos de regeneração dentinária reparadora. A semi-vida limitada e a necessidade de múltiplas aplicações podem incorrer em custos elevados. Como tal, estudos para avaliar a eficácia destas moléculas bioactivas nas terapêuticas de preservação da vitalidade pulpar devem ser determinadas, com ensaios *in vitro* e *in vivo* em animais (Smith *et al.*, 2012, 2012; Song *et al.*, 2017).

CAPÍTULO IV – OBJETIVOS

Neste estudo pretende-se avaliar a bioatividade de um biomaterial de regeneração dentinária, o Biodentine™ e, conseqüentemente, a possibilidade de ser utilizado com eficácia e segurança em proteções pulpares diretas em humanos. Para concretizar este objetivo será necessário conjugar alguns aspetos inerentes às diversas etapas do projeto.

Relativamente ao estudo *in vitro* pretende-se avaliar a viabilidade e a proliferação de células tipo odontoblastos da linha celular MDPC-23 na presença Biodentine™. De seguida, a avaliação da diferenciação e da mineralização será importante para determinar os efeitos efetivos deste material, na dentinogénese reparadora.

Relativamente ao estudo animal, pretende-se avaliar o efeito bioativo do Biodentine™, nomeadamente a formação de dentina reparadora e reacional e a diminuição dos efeitos inflamatórios ao longo do tempo, após a exposição pulpar.

No estudo clínico pretende-se, após a realização de uma revisão sistemática da literatura com meta-análise sobre o desempenho clínico dos biomateriais, Life®, WhiteProRoot®MTA e Biodentine™, abordar os fatores de sucesso/insucesso clínico após o tratamento de exposições pulpares diretas com os biomateriais. Consideraram-se fatores a estudar: avaliação clínica da ausência ou na presença de sintomatologia compatível com estados pulpares inflamatórios; avaliação radiográfica coronária de alterações estruturais da restauração coronária que suporta a reparação dos tecidos pulpares, e avaliação radiográfica radicular de sinais de lesão apical.

Em termos globais, pretende-se avaliar o desempenho do Biodentine™, quando comparado com o WhiteProRoot®MTA. Esta avaliação far-se-à pela conjugação dos resultados nas várias etapas do estudo, nomeadamente com os resultados da proliferação, da diferenciação e da mineralização das células tipo-odontoblasto de ratos e os efeitos anti-inflamatórios e de

formação de dentina reparadora em modelo animal. Os sinais clínicos de preservação da vitalidade do tecido pulpar nos doentes tratados com este material poderão indicar um efeito potenciador da dentinogénese reparadora. As vantagens da manipulação clínica que lhe são conhecidas, aliadas a resultados favoráveis pós-terapêutica, poderão potenciar as suas vantagens relativamente a outros materiais similares.

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO V — ESTUDOS *IN VITRO*

Dado o prolongado período de tempo que os materiais para proteções pulpares diretas estão em contato com o tecido pulpar, é de valor fundamental a sua biocompatibilidade. A importância da resposta e das interações celulares justifica a realização de estudos *in vitro* com vista à avaliação da citotoxicidade e à caracterização do efeito biológico do material e dos mecanismos celulares subjacentes. Assim, a realização deste estudo *in vitro*, como primeira abordagem no nosso projeto, foi óbvia.

Na primeira fase do trabalho, tentou-se estabelecer uma cultura primária de células odontoblásticas. No entanto, as dificuldades técnicas, o tempo de otimização destas culturas e a sua imprescindível caracterização antes do início dos testes citotóxicos *in vitro* dos biomateriais, determinaram a opção por uma linha celular já estabelecida e imortalizada. Assim, a linha celular utilizada foi a *MDCP-23*, generosamente cedida pela Professor Jacques Nör da *University of Michigan, Ann Arbor, USA*. Em 1998, Hanks e colaboradores estabeleceram esta linha celular a partir da papila dentária de um primeiro molar de ratinho CD-1 com 18-19 dias fetais. Esta linha foi desenvolvida como uma linha imortalizada espontaneamente e propagada. Após a passagem #23, a linha celular expressou marcadores específicos do fenótipo dos odontoblastos e foi designada por *mouse dental papilla cell-23* (MDPC-23). O resultado foi a obtenção de uma linha celular com elevada atividade de fosfatase alcalina, com capacidade de formar múltiplos nódulos mineralizados em camada, designados por depósitos de cálcio assim como, expressar DMP-1, uma proteína da matriz extracelular da dentina implicada na regulação da mineralização. Apresenta um tempo de duplicação celular inferior a 24 horas (Duan *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2015). Morfologicamente, os autores responsáveis pelo estabelecimento desta linha, descrevem-na como tendo uma forma epitelióide, mas simultaneamente, com múltiplos e curtos processos membranares, mas mais pequenas do que os fibroblastos. Estas células tendem a

proliferar e a formar aglomerados desde o ponto de adesão, em vez de migrarem após a divisão (Hanks *et al.*, 1998). Num estudo de Hanks e colaboradores foi demonstrado que, após 77 passagens em cultura, esta linha celular continuava a expressar consistentemente RNA mensageiro (do inglês, *messenger ribonucleic acid*— mRNA) para a codificação da sequência de DSP, de ALP, de OPN, de OCN e de colagénio do tipo I, sendo estas proteínas específicas da dentina e sintetizadas, principalmente, por odontoblastos. Considera-se, portanto, que esta linha celular constitui um bom modelo (Hanks *et al.*, 1998; Semeghini *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 1998), que mimetiza a resposta odontoblástica aos agentes químicos e físicos do meio externo e, conseqüentemente, permite conhecer parte dos mecanismos que ocorrem na dentinogênese.

A norma ISO 10993-5 do “*International Standard of Biological Evaluation of Medical Devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity*” (ISO, 2009) estabelece diretrizes importantes sobre os estudos de citotoxicidade celular realizados com o objetivo de determinar os efeitos biológicos de materiais para utilização em medicina. Esta norma foi fundamental para a planificação dos ensaios *in vitro*, da qual se considerou a técnica de meios condicionados com os substratos em estudo. Assim, para este trabalho, os meios de cultura celular foram incubados com o substrato numa relação de 250 mm² de superfície de contato do material por mL de meio de cultura (ISO, 2009; Zhou *et al.*, 2013).

Material e Métodos

Biomateriais

Os materiais selecionados para este estudo pretenderam representar cada um dos três tipos de biomateriais utilizados nas terapêuticas de proteções pulpares diretas e acima descritos. Assim, foi selecionado o Life[®], cimento à base de hidróxido de cálcio; o WhitePro[®]Root MTA representativo de um agregado de trióxidos minerais; e o Biodentine[™], cimento à base de silicato de cálcio. As composições químicas dos três materiais estão descritas na Tabela 1. Outros

dados, como o lote e a data de validade dos materiais utilizados no estudo *in vitro*, estão descritos no anexo I.

Tabela 1: Descrição da composição química dos biomateriais utilizados.

Material (marca comercial)	Composição química	Fabricante
Life[®]	<u>Pasta base</u> : óxido de zinco, hidróxido de cálcio, óxido de cálcio. <u>Pasta catalisadora</u> : salicilato de metilo, sulfato de bário, dióxido de titânio, 2,2-dimetilpropano-1,3-diol.	Kerr Hawe, Bioggio, Switzerland
WhiteProRoot[®] MTA	<u>Pó</u> : fosfato de cálcio, óxido de cálcio, sílica, óxido de bismuto. <u>Líquido</u> : água destilada	Dentsply, Maillefer, Tulsa Dental Specialties, Switzerland
Biodentine[™]	<u>Pó</u> : silicato tricálcico, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de ferro, óxido de zircônio. <u>Líquido</u> : cloreto de cálcio (acelerador), polímero hidrossolúvel, água.	Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France

Os materiais prepararam-se segundo as instruções do fabricante, exceto o WhiteProRoot[®] MTA que foi manipulado, para maior facilidade de utilização, como se descreve em seguida.

O Life[®] apresenta-se como um sistema de duas pastas, pasta base e catalisadora que se misturam em partes iguais. O WhiteProRoot[®] MTA foi preparado misturando o pó, que é apresentado numa saqueta, e o líquido, apresentado em pipeta, na proporção recomendada pelo fabricante, mas com mistura mecânica recorrendo a um aparelho de vibração durante 30 segundos a 4000 rpm (Ventura Mix). O Biodentine[™] apresenta-se em forma de pó e líquido, o primeiro apresentado na forma de cápsula e o segundo em pipeta. Para preparar a mistura colocou-se o líquido na cápsula e o preparado foi submetido a vibração durante 30 segundos a 4000 rpm (Ventura Mix).

Colocaram-se os materiais em moldes de placas de policloreto de polivinila (do inglês *Polyvinyl Chloride* - PVC) de 3 mm de diâmetro por 1,5 mm de espessura, e designados por

pellets. Através do cálculo da área de superfície de contato do *pellet*, elaborado a partir do molde utilizado e com base na norma ISO já referida, concluiu-se que seriam necessários 9 *pellets* por mL de meio condicionado, para cada um dos biomateriais.

Os tempos de presa total destes materiais são diferentes e foram cumpridos de acordo com as indicações de cada fabricante. O Life[®] e o Biodentine[™] mantiveram-se durante 24 horas a uma temperatura de 37°C numa atmosfera com 95% de humidade relativa enquanto se armazenou o WhiteProRoot[®]MTA durante 72 horas nas mesmas condições de humidade e de temperatura, em incubadora HeraCell 150.

Após a tomada de presa, removeram-se os *pellets* de cada biomaterial dos moldes de PVC e colocaram-se em placas de 6 poços. Procedeu-se à esterilização dos mesmos numa caixa com lâmpada de luz ultravioleta (U.V.) durante 20 minutos como a apresentada na Figura 8 (ISO, 2009; Zhou *et al.*, 2013).

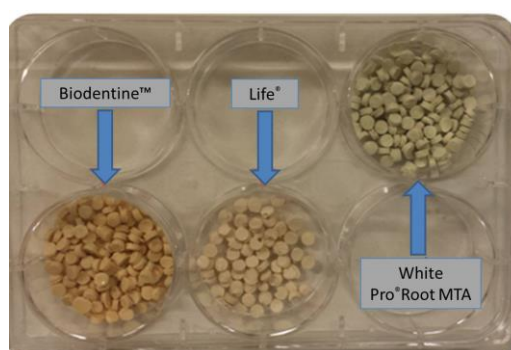


Figura 8: Materiais preparados em forma de pellets acondicionados numa placa de 6 poços (Sarstedt[®] 83.1835) para a esterilização com lâmpada U.V..

Após a esterilização, procedeu-se à preparação dos meios condicionados. Para tal, colocaram-se os *pellets* num tubo de *falcon*, a que se adicionou o volume correspondente de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM Sigma D-5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (do inglês *fetal bovine serum* - FBS, Sigma F7524). Efetuaram-se todos estes procedimentos na câmara de fluxo laminar e realizou-se a manipulação com material estéril. Colocaram-se de seguida os tubos, durante 24 horas a 37°C, na incubadora HeraCell 150.

Após 24 horas, considerou-se que o meio condicionado obtido de cada material de estudo correspondia a uma concentração inicial de 1/1 – 100%, e realizaram-se quatro diluições (1/2, 1/4, 1/8, e 1/16 que correspondem respetivamente a 50%, 25%, 12,50% e 6,25%) onde metade do volume da solução inicial foi diluída em igual volume de DMEM com 10% de FBS, formando assim a diluição 1/2 e, assim sucessivamente, como demonstrado na Figura 9 (ISO, 2009; Zhou *et al.*, 2013).

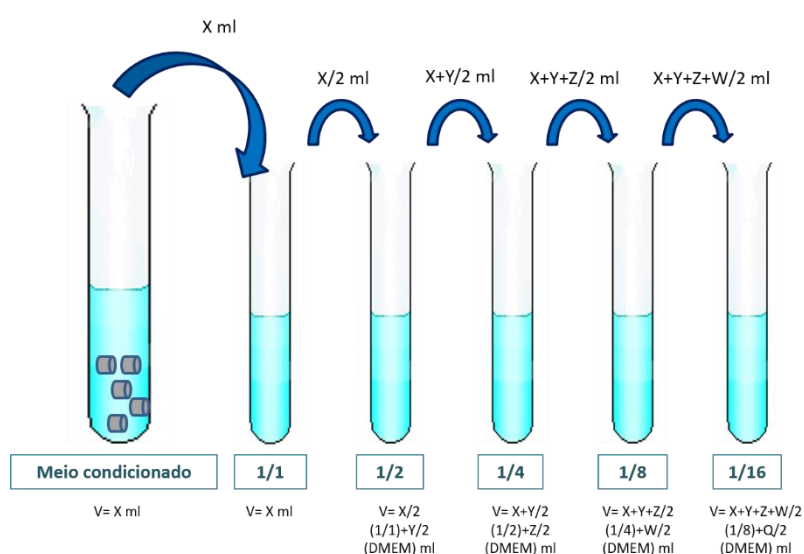


Figura 9: Esquema representativo da preparação dos meios condicionados e respetivas diluições.

Avaliou-se o pH dos meios condicionados utilizando amostras de cada concentração. Não se procedeu a qualquer ajuste de pH de nenhum dos meios (ISO, 2009).

Culturas celulares

Descongelou-se e propagou-se em cultura aderente de acordo com as recomendações do grupo de investigação que a cedeu, a linha celular MDPC-23, cuja morfologia pode ser observada na Figura 10. Assim, para todos os estudos, a linha celular foi mantida a 37°C numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ em incubadora HeraCell 150. Utilizou-se o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS (Sigma F7524), 250 μM de piruvato de sódio (Gibco

11360) e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Sigma A5955) (Lopez-Cazaux *et al.*, 2006; Salehi *et al.*, 2016; Semeghini *et al.*, 2012; Tang e Saito, 2015).

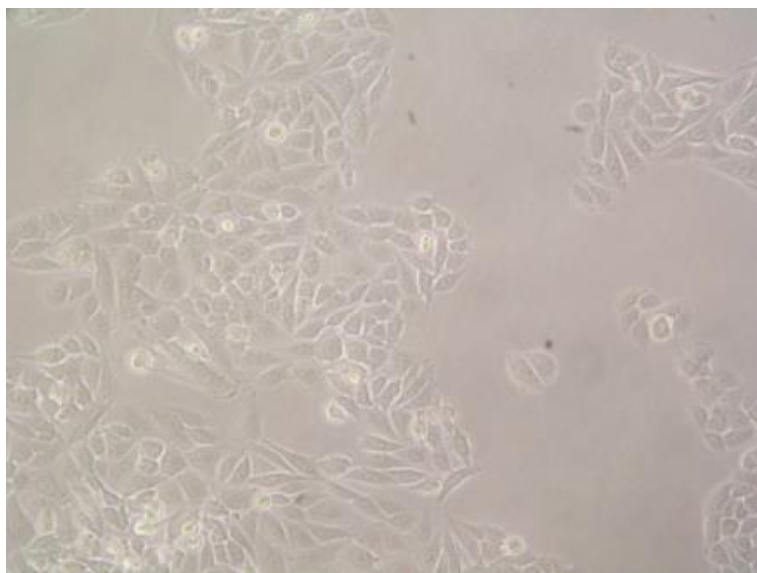


Figura 10: Linha celular MDPC-23 observada num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) com ampliação de 100x.

Para a realização dos estudos *in vitro* foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para isso, removeu-se o meio de cultura e lavou-se com 5 mL de tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered saline* - PBS). O PBS foi obtido através da mistura de cloreto de sódio (NaCl) a 137 mM (Sigma, S7653), cloreto de potássio (KCl) a 2,7 mM (Sigma, P9333), hidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) a 10 mM (Sigma, S5011) e hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) a 1,8 mM (Sigma, P0662), dissolvidos em água destilada com pH ajustado a 7,4. De seguida, incubaram-se as culturas celulares com 3 mL de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25 % (Sigma T4049) durante cinco minutos a 37°C, para que ocorresse a separação celular. Para inativar a tripsina, adicionaram-se 9 mL de meio de cultura e centrifugou-se as suspensões celulares a 120 xG durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R). Após a centrifugação, suspenderam-se os *pellets* num volume conhecido de meio de cultura. Procedeu-se à contagem de uma alíquota da suspensão celular, depois de corada com azul de tripano, em câmara de *neubauer*, num microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS 100) com ampliação de 100 x. Após

a contagem, ajustou-se o volume das suspensões celulares com meio de cultura, de forma a obter a concentração celular pretendida para cada estudo (Poggio *et al.*, 2014, 2014).

Para se poder efetuar convenientemente a planificação dos ensaios *in vitro*, foi necessário verificar a taxa de duplicação celular da linha celular MDCP-23. Assim, colocaram-se 500.000 células num frasco de 25 cm² com 5 mL de DMEM. Após 24 horas determinou-se o número de células presentes no mesmo frasco. Calculou-se o tempo de duplicação celular a partir da Equação 1.

$$TD = \text{tempo de incubação} \times \left[\frac{\ln(2)}{\ln(n^{\circ} \text{ células final} / n^{\circ} \text{ células inicial})} \right]$$

Equação 1

Estudos de citotoxicidade

Prepararam-se suspensões com 50.000 células/mL que foram distribuídas por placas de 96 poços (Sarstedt® 83.1835). Estas placas foram incubadas durante 24 horas para permitir a adesão das células.

Após este período, administraram-se o Biodentine™, o WhiteProRoot® MTA e o Life® sob a forma de meios condicionados nas várias concentrações acima referidas. Em cada poço foi substituído o DMEM por 200 µL de meio condicionado, de acordo com a sequência de concentrações. Em todos os ensaios foram realizados controlos que corresponderam a culturas celulares não submetidas a qualquer tratamento, apenas mantidas em DMEM com 10% de FBS. Os poços limítrofes a cada experiência foram preenchidos com DMEM, de modo a garantir condições de humidade semelhantes em todos os poços. As culturas celulares foram incubadas durante 24, 72 e 120 horas.

Atividade metabólica

Para avaliar o efeito dos biomateriais na atividade metabólica das células realizou-se o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O MTT 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 ou succinato-coenzima Q redutase. As desidrogenases têm a capacidade de clivar os anéis de tetrazólio do MTT de cor amarela e formar cristais de formazano de cor azul escura que podem ser posteriormente solubilizados e quantificados por meios espectrofotométricos, com um comprimento de onda de 570 nm. Este método colorimétrico constitui, pois, uma forma indireta de avaliar a função mitocondrial da célula (Lodish *et al.*, 2008; Poggio *et al.*, 2014) uma vez que a quantidade de cristais de formazano obtidos é diretamente proporcional à atividade metabólica.

Para a avaliação da atividade metabólica, o meio das várias culturas celulares foi aspirado e procedeu-se à lavagem de cada poço com PBS. Posteriormente, em cada poço da placa de cultura, colocaram-se 50 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma M2128) preparada em PBS, com pH de 7,4, e incubaram-se as placas no escuro a 37°C durante a noite (Wei *et al.*, 2012). De forma a solubilizar os cristais de formazano obtidos, acrescentaram-se a cada poço 100 µL de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol e deixaram-se as placas em agitação durante 30 minutos. O conteúdo de cada poço foi, posteriormente, homogeneizado e a absorvância foi quantificada com o comprimento de onda de 570 nm com um filtro de referência de 620 nm, usando o espectrofotômetro Biotek® Synergy HT. A atividade metabólica expressou-se como percentagem da atividade metabólica das culturas submetidas aos meios condicionados em relação à atividade metabólica das culturas celulares controlo.

Viabilidade celular

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) permite avaliar a viabilidade celular por correlação com o conteúdo proteico total. A sulforrodamina B é um corante arroxeadado, aniónico e com afinidade para os aminoácidos básicos, aos quais se liga de forma electroestática e dependente do pH. Sob condições ácidas liga-se aos aminoácidos das proteínas celulares e, sob condições alcalinas, pode ser extraído. Após fixação, solubilização e medição por métodos

espectrofotométricos, os resultados obtidos correlacionam-se com o número de células através do conteúdo proteico total (Papazisis *et al.*, 1997; Vichai e Kirtikara, 2006; Voigt, 2005).

Para a realização do ensaio do SRB, descartou-se o meio de cultura das culturas celulares, efetuou-se uma lavagem com PBS e deixaram-se secar. Adicionaram-se 50 µL de ácido acético a 1% em metanol e incubaram-se durante 1 hora à temperatura de 4°C. Após este período, retirou-se o metanol e deixaram-se secar à temperatura ambiente. Adicionaram-se 50 µL de uma solução de sulforrodamina B na concentração de 4 % (Sigma S9012) em ácido acético na concentração de 1% e incubaram-se durante 2 horas ao abrigo da luz. Após este período de tempo, lavaram-se as placas de modo a remover o excesso de SRB e, após secagem, adicionaram-se 150 µL de tampão tris(hidroximetil)aminometano na concentração de 10 mM, conjugado com a base hidróxido de sódio, até um pH=10 (TRIS-NaOH). A leitura da absorvância foi feita com o comprimento de onda de 540 nm, com um filtro de referência de 690 nm, num espectrofotómetro Biotek® Synergy HT.

Os resultados são expressos como percentagem do conteúdo proteico das culturas submetidas aos meios condicionados em relação ao conteúdo proteico das culturas celulares controlo.

Nos estudos subsequentes, nomeadamente na avaliação dos tipos de morte celular, potencial de membrana mitocondrial, ciclo celular e stresse oxidativo, expuseram-se as culturas celulares aos meios condicionados com biomateriais nas concentrações de 6,25%, 50% e 100% durante um período de 120 horas. Constituíram exceção os estudos com o biomaterial Life®, com o qual a exposição às concentrações de 50% e de 100% não proporcionaram um número de células suficiente para prosseguir com a análise por citometria de fluxo. Foram preparadas culturas celulares controlo, não submetidas a qualquer tratamento, em todas as experiências.

Proliferação celular

A preparação dos ensaios por citometria de fluxo iniciou-se pela contagem do número de células após as 120 horas do tratamento com os meios condicionados. Para além da identificação

do número de células necessário para os ensaios, esta metodologia foi, também, uma forma de avaliar a viabilidade destas populações celulares.

Com este objetivo prepararam-se suspensões com 50.000 células/mL que foram distribuídas por frascos de 75 cm². Estas placas foram incubadas durante 24 horas para permitir a adesão das células às mesmas.

Após a exposição aos meios condicionados durante 120 horas efetuou-se a contagem celular no Hemascreen 18 (Hospitex Diagnostics, Florence, Italy). Os resultados expressos traduzem a razão entre o número de células contadas e o número de células plaqueadas.

A viabilidade e os tipos de morte celular, o potencial de membrana mitocondrial, o ciclo celular e o stresse oxidativo avaliaram-se por citometria de fluxo. A citometria de fluxo permite contar, examinar e classificar células ou outras partículas microscópicas suspensas em meio líquido. Esta técnica permite analisar de forma rápida, várias características físicas e químicas de células em suspensão, através de um aparelho de deteção ótico-eletrónico.

Morte celular

Tipos de morte celular

Para avaliar a morte celular, conseqüente da aplicação dos materiais indutores da dentinogénese, utilizou-se a dupla marcação com a anexina V (AnV) ligada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com o iodeto de propídeo (IP), que permitem quantificar a viabilidade celular distinguindo os diferentes tipos de morte celular, como a necrose e a apoptose. A anexina V permite identificar as células que se encontram em apoptose, uma vez que se liga especificamente à fosfatidilserina, um fosfolípido da bicamada lipídica que, nas células em apoptose, se transloca do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. Por outro lado, o iodeto de propídeo é um corante que se intercala no DNA das células após lesão membranar, marcando os núcleos daquelas que se encontram em apoptose tardia ou em necrose. Assim, conseguem-se distinguir quatro grupos de células: as células vivas, que se apresentam negativas tanto para a marcação com a anexina V como para a marcação com o

iodeto de propídeo; as células em apoptose, que se apresentam positivas para a marcação com a anexina V e negativas para a marcação com o iodeto de propídeo; as células que se encontram em apoptose tardia/necrose, que se apresentam positivas para as duas marcações; e as células em necrose, que se apresentam negativas para a marcação com a anexina V e positivas para a marcação com o iodeto de propídeo (Wei *et al.*, 2012).

Para esta avaliação, destacaram-se e concentraram-se, por centrifugação a 120 xG durante 5 minutos, as culturas celulares. Lavaram-se os *pellets* com PBS e incubaram-se com 100 µL de tampão de ligação (constituído por 0,01 M de Hepes [Sigma, H7523], 0,14 mM de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl₂ [Sigma, C4901]), 2,5 µL de An-V FITC (Immunostep ANXVFKIT Immunotech) e 1 µL de IP (KIT Immunotech)), durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 400 µL de PBS e analisou-se no citômetro FACSCalibur (BD Biosciences). Para a análise e quantificação da informação utilizou-se um *software* específico (Paint-a-Gate 3.02, Machintosh Software) que corre em computador dedicado. Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose.

Potencial de membrana mitocondrial

Determinou-se o potencial de membrana mitocondrial usando uma sonda fluorescente, o JC-1 (do inglês, *5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*). O JC-1 é um catião lipofílico que existe em duas formas, monómeros (M) e agregados (A), consoante o estado de polarização/despolarização da membrana mitocondrial, emitindo fluorescência com comprimentos de onda diferentes. Quando o potencial de membrana mitocondrial é elevado forma agregados que emitem fluorescência vermelha. Por sua vez, à medida que o potencial de membrana mitocondrial diminui, ou em casos em que a membrana se encontra despolarizada, o JC-1 mantém-se no citoplasma sob a forma de monómeros que emitem fluorescência verde. Assim, a razão entre a fluorescência verde e vermelha (M/A, razão monómeros/agregados), determinada por citometria de fluxo, fornece uma estimativa do potencial de membrana mitocondrial (John, St. *et al.*, 2006; Proost, De *et al.*, 2008).

Após decorrido o tempo experimental, centrifugaram-se aproximadamente 10^6 células com PBS durante 5 minutos a 120 xG que foram, posteriormente, suspensas em 1 mL do mesmo tampão. Incubaram-se as suspensões celulares durante 15 minutos à temperatura de 37°C e ao abrigo da luz com 1 μ L de JC-1 (Sigma T4069), preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5 mg/mL e, posteriormente diluído, de modo a obter uma concentração final de 5 μ g/mL. De seguida, lavaram-se novamente as suspensões com PBS e suspenderam-se em 400 μ L do mesmo tampão. A deteção foi efetuada no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) com o comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 590 nm. Os resultados obtidos correspondem à média de intensidade de fluorescência (MIF) para os agregados e para os monómeros, tendo-se calculado posteriormente a razão M/A para cada condição experimental.

Ciclo celular

Avaliou-se o ciclo celular por citometria de fluxo, com recurso ao iodeto de propídeo (IP), corante comumente utilizado para análise de DNA e do ciclo celular. Este corante tem a capacidade de se ligar ao DNA, intercalando-se na dupla cadeia da macromolécula, em que a quantidade de corante ligado é proporcional à quantidade de DNA. Assim, é possível quantificar o conteúdo de DNA, permitindo conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular. As células podem ser classificadas como células em fase G2, M, G0, G1 ou S (Douglas *et al.*, 1995; Kalejta, Shenk e Beavis, 1997).

Para este ensaio, as células após o tempo experimental, centrifugaram-se a 120 xG durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 μ L de etanol a 70% com o tubo em agitação no vórtex e incubaram-se os tubos durante 30 minutos a 4°C. Lavaram-se as células com 2 mL de PBS e centrifugou-se a 120 xG durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionaram-se 500 μ L de *PI/RNase solution* (Immunostep PI/RNase), e incubaram-se durante 15 minutos no escuro a 37°C. Fez-se a deteção no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) e utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

Os resultados são apresentados sob a forma de percentagem de células na fase Pré-G0, na fase G0/G1, na fase S ou na fase G2/M.

Stresse oxidativo

Determinou-se a expressão intracelular de peróxidos, por citometria de fluxo, através da oxidação intracelular da sonda não fluorescente DCFH₂-DA (do inglês, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Este composto lipossolúvel, entra nas células e acumula-se principalmente no citosol, onde é desacetilado por esterases intracelulares sob a forma de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este produto, não fluorescente, é oxidado na presença de peróxidos com formação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), um composto que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522 nm, quando excitada com luz de comprimento de onda de 498 nm. A fluorescência é proporcional à concentração de peróxidos intracelulares, incluído o peróxido de hidrogénio (Camargo *et al.*, 2009; Dikalov, Griendling e Harrison, 2007; Tarpey, 2004).

Após o período experimental centrifugaram-se as suspensões celulares, com aproximadamente 10⁶ células, a 120 xG durante 5 minutos e adicionou-se PBS para lavar. Suspendeu-se o *pellet* em 1 mL de PBS e incubou-se durante 45 minutos, sem luz, a 37°C com 5 µM de DCFH₂-DA (Molecular probes, Invitrogen). Lavou-se a suspensão celular com PBS, foi centrifugada a 120 xG durante 5 minutos e suspensas as células em tampão. Posteriormente, fez-se a deteção, por citometria de fluxo, no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) e utilizou-se o comprimento de onda de excitação de 620 nm. Os resultados são obtidos sobre a forma de média de intensidade de fluorescência e foram normalizadas em relação aos controlos.

Morfologia celular

Numa placa de 12 poços colocaram-se lamelas com o auxílio de instrumentos estéreis, na câmara de fluxo laminar. Distribuíram-se células da linha MDPC-23 numa concentração 143.000 células por mL de meio, em 700 µL de DMEM suplementado com 10% de FBS. Após 24 horas de

incubação, para adesão das células à lamela, sujeitaram-se estas aos meios condicionados dos diferentes materiais Life[®], WhiteProRoot[®]MTA e Biodentine[™] na concentração 50%, e só com DMEM suplementado com 10% de FBS para o grupo controlo. Colocaram-se as culturas celulares a 37°C, numa atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, durante 120 horas, na incubadora HeraCell 150.

Efetuiu-se a avaliação das características morfológicas, com recurso à microscopia ótica, após a coloração das células com meio *May-Grünwald Giemsa*. Esta coloração constitui uma modificação à coloração de *Romanowsky*, que é metacromática e que demonstra a arquitetura geral celular de forma rápida e fácil. Os corantes utilizados conferem propriedades cromáticas às células onde os núcleos aparecem corados de vermelho a violeta e o citoplasma de rosa a azul.

Os esfregaços das lamelas, depois de secos ao ar, sujeitaram-se a 1,5 mL de solução de *May-Grünwald* durante 3 minutos e, posteriormente, a igual volume de água destilada durante 1 minuto. Após decantação desta última, acrescentaram-se 3 a 4 gotas da solução de *Giemsa*, que atuou durante 15 minutos. Após estes procedimentos, lavaram-se as lâminas em água corrente e observaram-se ao microscópio ótico Nikon Eclipse NI. Obtiveram-se as fotografias a partir da câmara Nikon OS-Fi2 acoplada ao microscópio e, posteriormente, captaram-se e analisaram-se as imagens com recurso ao software NIS-Elements D. Obtiveram-se fotografias com ampliação de 100x, 200x e 500x.

Diferenciação celular

Nos estudos subsequentes em que as culturas celulares foram marcadas para determinar a atividade e a expressão génica da fosfatase alcalina, expuseram-se as células aos três biomateriais nas concentrações de 6,25% e de 50% durante 96 horas. Para todas as experiências foram preparadas culturas celulares controlo, não submetidas a qualquer tratamento.

Fosfatase alcalina - ensaio enzimático

As fosfatases alcalinas são uma classe de enzimas que hidrolisam moléculas que contêm fosfato sob condições alcalinas. Nos seres humanos, existem principalmente quatro tipos diferentes destas enzimas, presentes nos tecidos do intestino, da placenta e outras não específicas de tecido como o exemplo observado na Figura 11. Este último tipo de isoenzima não específica de tecido pode ser expressa no fígado, no osso, no rim e nos tecidos da cavidade oral como a polpa dentária e o tecido periodontal (O'Connor *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012)



Figura 11: Diagrama colorido da estrutura dimérica da fosfatase alcalina bacteriana (Coleman, 1992).

A fosfatase alcalina é um marcador fenotípico de células pluripotentes (do inglês *pluripotent stem cells* - PSCs), incluindo as indiferenciadas embrionárias e as pluripotentes indutoras. Mais recentemente, o aparecimento de colônias ALP positivas, durante as fases iniciais da reprogramação, levou a que seja utilizada como um indicador inicial de reprogramação bem-sucedida. No entanto, a expressão de ALP é pouco sensível na distinção de células diferenciadas e não diferenciadas, uma vez que o seu nível de expressão é extremamente dependente do tipo de linha celular. A coloração ALP tem sido utilizada como um método rápido e fácil que resulta num cromogéneo específico ou coloração fluorescente das células (Lu *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012). Ao contrário de outras metodologias o método *Alkaline Phosphatase Live Stain* permite a marcação de células vivas. Este substrato para a fosfatase alcalina é permeável intracelularmente, sendo metabolizado pelas enzimas ALP presentes

dando origem a um produto fluorescente verde brilhante. Este difunde-se para fora da célula, não deixando nenhum produto enzimático acumulado na mesma.

Para a realização deste ensaio foi utilizado o kit *Alkaline Phosphatase Live Stain* (ThermoFisher - Life Technologies Corporation) que pode ser aplicado sob culturas celulares aderentes sem perda de potencial de proliferação ou diferenciação das mesmas. Após a sua remoção do meio de cultura, as células perdem o sinal de fluorescência em 60 a 90 minutos.

Para este ensaio, distribuíram-se as células da linha MDPC-23 em placas de 96 poços, numa densidade de 50.000 células por mL de meio às quais se adicionaram 200 µL de DMEM suplementado com 10% de FBS. Após 24 horas de incubação, para adesão das células aos poços, sujeitaram-se aos procedimentos referidas atrás.

Lavaram-se as culturas celulares duas vezes durante 2 a 3 minutos com meio DMEM sem FBS, pré-aquecido, preparado de fresco. Para a preparação do substrato *AP Live Stain* procedeu-se à sua descongelação à temperatura ambiente e preparou-se a solução de trabalho 1x a partir da diluição da solução 500x com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12, Gibco® 31330-038) numa concentração de 5,14 µL por mL. De seguida, o substrato *AP Live Stain* foi imediatamente aplicado sobre as culturas celulares de estudo. Incubaram-se as células com a solução durante 45 minutos a 37°C, numa atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO₂ e, de seguida, lavaram-se cuidadosamente duas vezes durante 5 minutos com o meio DMEM sem FBS para remover a solução de coloração não internalizada. Logo após, marcaram-se as culturas celulares com o corante nuclear *Hoechst 33252*, com uma solução de 5 µg/mL da sonda em PBS durante 15 minutos no escuro. Após a lavagem final com PBS, procedeu-se à visualização das culturas celulares sob microscopia fluorescente, utilizando os filtros FITC padrão e o DAPI (Singh *et al.*, 2012).

Adquiriram-se as imagens no microscópio ótico Leica com uma resolução de 1920x1080; ampliação 100x; exposição de 46,8 a 50 msegundos para o filtro azul e 1 segundo para o filtro verde; ganho 2,3, saturação 2 e gama 1,04. As imagens obtidas foram posteriormente processadas com o *software ImageJ* (Java-based image processing program).

Fosfatase alcalina - expressão gênica

Efetou-se a quantificação da expressão do gene *ALP* por *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) em tempo real. Esta técnica utiliza um sistema de detecção de fluorescência para determinar os níveis de expressão gênica e apresenta como principal vantagem a quantificação fiável e reproduzível de RNA inicial. Avaliou-se então a expressão gênica, por quantificação relativa com recurso ao sistema de detecção de amplificação *SybrGreen* da BioRad utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Daltoé *et al.*, 2016). Este método de quantificação relativa baseia-se na normalização dos resultados por comparação com a quantificação da expressão de um gene constitutivamente expresso. Distribuíram-se as células da linha MDPC-23 por frascos de 75 mL, numa densidade variável, de modo a garantir o número de células suficiente para a realização da técnica. Assim, distribuíram-se 100.000 células por mL de meio para o controlo, 150.000 células por mL de meio para os grupos dos biomateriais WhiteProRoot® MTA e Biodentine™. Para as concentrações do biomaterial Life® plaqueram-se 250.000 células por mL de meio para a concentração de 6,25% e 500.000 células por mL de meio para a concentração de 50%. Estas culturas celulares propagaram-se em 10 mL de DMEM suplementado com 10% de FBS. Após 24 horas de incubação, para adesão das células aos frascos, sujeitaram-se estas aos procedimentos referidas atrás.

Efetou-se a extração de RNA das células utilizando o NZYol (NZYtech). Este produto, constituído à base de fenóis, permite lisar as membranas celulares e expor o conteúdo celular conservando a integridade do RNA. Assim, lavaram-se aproximadamente 2 milhões de células em cultura duas vezes com PBS, por centrifugação a 200 xG durante 5 minutos à temperatura ambiente. Suspendeu-se o sedimento em 1 mL de NZYol, efetuando-se a lise por agitação intensa e sucessivas pipetagens. De seguida, as amostras incubaram-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se 200 µL de clorofórmio e agitaram-se os tubos manualmente durante 15 segundos. Seguiu-se nova incubação de 3 minutos à temperatura ambiente. Findo este tempo de incubação, centrifugaram-se os lisados a 4°C durante 15 min a 12.000 xG. Durante esta centrifugação originam-se duas fases na amostra, ficando o RNA na fase aquosa (superior). Removeu-se a fase aquosa para um novo tubo e

adicionaram-se 500 µL de isopropanol frio de modo a precipitar o RNA. As amostras incubaram-se, novamente, à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugaram-se a 12.000 xG durante 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 1 mL de etanol a 75%, por centrifugação a 7.500 xG durante 5 minutos a 4°C. O sedimento secou-se à temperatura ambiente de modo a permitir a evaporação do etanol e, posteriormente, suspendeu-se em água livre de RNases.

Quantificaram-se as amostras de RNA assim obtidas, e o grau de pureza avaliou-se recorrendo a espectrofotometria de absorção (NanoDrop® 1000 Spectrophotometer). Determinou-se o grau de pureza do RNA através da razão dos resultados obtidos com o comprimento de onda de 260 nm e de 280 nm, tendo sido utilizadas apenas as amostras com grau de pureza entre 1,95 e 2,05 e com concentração superior a 50 ng/µL. Posteriormente, armazenaram-se as amostras a -80°C. Seguidamente, procedeu-se à conversão do RNA para DNA complementar (cDNA) através do kit comercial *Superscript III* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, num tubo adicionaram-se *OligodT* na concentração de 5 µM, *random hexamers* na concentração de 5 ng/µL, 1 µg de RNA e uma mistura de desoxinucleotidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina (dNTPs) a uma concentração de 10 mM e água destilada livre de RNases. Aqueceu-se a mistura a 65°C durante 5 minutos e, de seguida, colocou-se em gelo. Posteriormente, adicionou-se tampão de síntese de cDNA, DTT na concentração de 0,1 M, um inibidor das RNases, o RNase OUT™, e a transcriptase reversa Supercript III (Invitrogen). Finalmente, incubou-se a mistura final a 25°C durante 10 minutos, a 50°C durante 50 minutos e a 85°C durante 5 minutos. Por fim adicionou-se RNase H e procedeu-se a nova incubação durante 20 minutos a 37°C. Estas incubações realizaram-se no termociclador MyCycler™ (Bio-Rad). Guardou-se o cDNA a -80°C para posterior utilização. Amplificou-se o cDNA de cada uma das amostras e quantificou-se através do uso de primers *forward* e *reverse* (*Gapdh*: forward 5'-GACAACCTTGGCATCGTGGA-3' e reverse 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'; *Alpl*: forward 5'-CGCCTATCAGCTAATGCACAACA-3' e reverse 5'-ATGAGGTCCAGGCCATCCAG-3' (Bae *et al.*, 2012; Nozaki *et al.*, 2005; Osyczka *et al.*, 2004), na concentração de 300 nM, a que se juntou uma mistura de reação contendo dNTP's, polimerase e *SyBrGreen* (*SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix*, Bio-Rad), o fluoróforo que se

incorpora na dupla cadeia de DNA emitindo fluorescência. A qPCR foi realizada no termociclador *CFX96 Touch System Real-Time PCR* (Bio-Rad). A reação de amplificação iniciou-se por um ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 30 segundos, seguida de 40 ciclos de amplificação, composto por uma fase de desnaturação a 95°C durante 10 segundos e um período de emparelhamento a 60°C durante 15 segundos. Por fim, efetuou-se uma curva *melting* através de um ciclo de desnaturação que decorreu entre os 55°C e os 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 10 segundos. Quantificaram-se as amostras em duplicado e para cada gene em estudo e, em cada placa de amplificação efetuou-se uma reta padrão, obtida através de diluições seriadas da amostra positiva. A obtenção deste parâmetro permitiu determinar a eficiência da reação, calculada através do declive da reta. Consideraram-se para o estudo, as placas de amplificação cuja eficiência se encontrava entre os 90% e os 105%, garantindo assim uma análise fidedigna dos resultados (Livak e Schmittgen, 2001). Os resultados representam a média \pm erro padrão de 4 experiências independentes, e expressaram-se em variação da expressão génica relativa ao gene *Gapdh*.

Mineralização

Nos estudos subsequentes em que se marcaram as culturas celulares para detetar a presença de sialoproteína da dentina, expuseram-se as células aos três biomateriais nas concentrações de 6,25% e de 50% durante 96 horas.

Nos estudos em que se submeteram as culturas celulares à coloração *Alizarin Red S*, as células expuseram-se aos três biomateriais nas concentrações de 6,25% e de 50% durante 120 horas. Para todas as experiências prepararam-se culturas celulares controlo, não submetidas a qualquer tratamento.

Sialoproteína de dentina

A matriz orgânica da dentina é composta por proteínas colagénicas e não colagénicas. Entre estas últimas, a sialoproteína da dentina (DSP) é expressa predominantemente nos

odontoblastos e em menor grau nos osteoblastos e, por isso, é considerada como um marcador genético representativo dos primeiros, desempenhando um papel fundamental na diferenciação dos odontoblastos e na dentinogênese (Rahman *et al.*, 2014). A DSP tem origem na parte N terminal da *DSPP*, sendo pouco fosforilada, rica em ácido aspártico e glutâmico, glicina e serina. Tem um peso molecular de 52.5 kDa, contendo cerca de 350 aminoácidos e 75 monossacarídeos (Goldberg *et al.*, 2011). A sialoproteína da dentina é uma glicoproteína rica em ácido siálico, expressa nos estádios iniciais do desenvolvimento dentário, antes da degradação da membrana basal. O mRNA da DSP foi detetado em pré-odontoblastos e em ameloblastos, sugerindo o seu papel importante na diferenciação dos odontoblastos (Garant, 2003).

Distribuíram-se as células da linha MDPC-23 por placas de 12 poços com lamelas numa densidade 143.000 células por mL de meio, e cultivadas em 700 µL de DMEM suplementado com 10% de FBS. Após 24 horas de incubação para adesão das células à lamela, sujeitaram-se estas às experiências.

Após o período experimental, lavaram-se as culturas celulares com PBS, fixaram-se com 3,7% de paraformaldeído durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavaram-se duas vezes com PBS. Procedeu-se de seguida à permeabilização com *Triton* 0,5% em PBS durante 15 minutos e, posteriormente, ao bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogénio a 0,3% em PBS durante 5 minutos. Após estes procedimentos, lavaram-se com PBS duas vezes e com PBS com 0,5% de BSA (do inglês *bovine serum albumin*) mais duas vezes. De seguida bloquearam-se as culturas celulares utilizando 2% de BSA durante 45 minutos. Lavou-se, novamente, com PBS com 0,5% de BSA uma vez e procedeu-se à incubação das culturas com o anticorpo primário [DSP(M-20) *Antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Europe, 1:100] durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação lavaram-se cinco vezes com PBS com 0,5% de BSA e procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário (*Polyclonal Rabbit Anti-goat immunoglobulins/HRP*, Dako, Denmark, 1:100) durante 90 minutos à temperatura ambiente. As diluições dos anticorpos foram efetuadas com PBS a 0,5% de BSA. Lavaram-se cinco vezes com PBS com 0,5% de BSA durante 1 minuto em cada lavagem e incubaram-se as culturas com uma mistura de substrato (*Substrate Buffer*, Dako, Denmark) e cromogénico (*DAB⁺ Chromogen*, Dako, Denmark) na concentração de 20 µL de cromogénico/mL de substrato durante 25 minutos.

Posteriormente, lavaram-se duas vezes com PBS com 0,5% de BSA e procedeu-se à contra-coloração com hematoxilina durante 15 minutos. De seguida lavou-se com uma sequência de água destilada, 0,037 mol/L de amónia (20 µL em 10 mL de água destilada) e de água destilada durante 5 minutos, e procedeu-se à montagem das lamelas nas lâminas. O meio de montagem utilizado foi o glicerol em PBS (Dako, Denmark). Deixou-se secar durante a noite e obtiveram-se imagens no microscópio ótico Moticam 1080 com uma resolução de 1920x1080, ampliação 100x. As imagens obtiveram-se todas com as mesmas definições.

Nas imagens obtidas, para uma avaliação qualitativa da marcação da proteína utilizou-se a objetiva 10X, com luminosidade mínima.

Depósitos de cálcio - morfologia

O ensaio com o corante *alizarin red S* (A5533 Sigma-Aldrich) é um ensaio citoquímico utilizado para determinar o grau de mineralização através da visualização dos depósitos de cálcio nas culturas celulares e secções tecidulares. O *alizarin red S* (do inglês, *3,4-Dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid sodium salt*) como observado na Figura 12, é um derivado de antraquinona, não é estritamente específico para o cálcio, uma vez que o magnésio, o manganês, o bário, o estrôncio e o ferro podem interferir, mas estes elementos normalmente não ocorrem em concentração suficiente para interferir com a coloração. Os depósitos de cálcio extracelulares formam um complexo corante-cálcio de cor vermelha por um processo de quelação, sendo uma reação birrefringente (Eid *et al.*, 2013; Paul, Reginato e Schumacher, 1983).

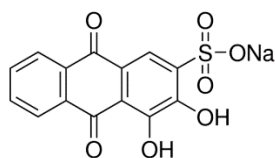


Figura 12: Fórmula química do *3,4-Dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid sodium salt* (*alizarin red S*)

Distribuíram-se as células da linha MDPC-23 por placas de 12 poços numa densidade 143.000 células por mL de meio, e cultivaram-se em 700 μ L de DMEM suplementado com 10% de FBS. Após 24 horas de incubação, para adesão das células à placa, estas foram sujeitas às experiências. Utilizou-se a solução de *alizarin red S* na concentração de 40 mM. Para esta solução, o valor de pH é crítico e deve ser entre 4,1 a 4,3. A obtenção do pH de 4,2 ajustou-se com NH_4OH e HCl (Atari *et al.*, 2012; Cai, Zhang e Chen, 2016; Salehi *et al.*, 2016; Tang e Saito, 2015; Yang *et al.*, 2010).

Após o período experimental, lavaram-se as culturas celulares com PBS três vezes, fixaram-se com paraformaldeído na concentração de 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente, e lavaram-se novamente com PBS três vezes. Por fim coraram-se com uma solução preparada de *Alizarin Red Staining* durante 20 minutos a 37°C. Após a coloração sujeitaram-se as placas a várias lavagens com PBS até à remoção total do corante (Lin *et al.*, 2011; Man *et al.*, 2012).

Fotografaram-se as placas para obtenção das imagens através do microscópio ótico MoticamPro 285A com uma resolução de 1360x1024. Obtiveram-se as imagens todas com as mesmas definições. Nas imagens obtidas para uma avaliação qualitativa dos nódulos (depósitos de cálcio) corados utilizou-se a objetiva 10X.

Depósitos de cálcio - quantificação

Para a análise quantitativa, após lavagem das células com PBS, adicionaram-se a cada poço 200 μ L duma solução de extração composta por 10% (w/v) de ácido acético e 20% (w/v) de metanol, durante 40 minutos à temperatura ambiente, com agitação. Mediu-se a absorvância dos extratos com o comprimento de onda de 490 nm num espectrofotómetro Biotek® Synergy HT (Cai, Zhang e Chen, 2016). Os resultados da análise quantitativa apresentam-se sob a forma de média \pm erro padrão e variação em relação ao controlo.

Análise estatística

Realizou-se a análise estatística com recurso ao *software* IBM® SPSS® versão 20. Para a avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas utilizou-se o teste *Shapiro-Wilk*.

Realizou-se a comparação da atividade metabólica das culturas celulares submetidas a tratamento com as culturas celulares controlo, utilizando o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) de um fator nos casos em que se verificou uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Quando se verificou o contrário, realizou-se o teste *Kruskal-Wallis*. Efetuou-se o mesmo tipo de análise para as comparações múltiplas entre grupos e tempos experimentais.

Compararam-se os resultados do conteúdo proteico tendo como base os mesmos critérios e os mesmos testes da atividade metabólica.

Relativamente às vias de morte, potencial de membrana e ciclo celular, realizou-se a comparação entre condições com o teste ANOVA quando se verificou uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e quando o contrário se verificava foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. De seguida realizaram-se comparações múltiplas entre grupos experimentais utilizando testes não paramétricos como o teste de *Kruskal-Wallis* ou o teste de *Mann-Whitney-Wilcoxon* usado para testar a heterogeneidade de duas amostras ordinais.

Relativamente à produção de superóxidos, realizou-se a comparação entre condições com o teste ANOVA quando se verificava uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e quando o contrário se verificava realizou-se o teste de *Kruskal-Wallis*. De seguida realizaram-se comparações múltiplas entre grupos experimentais utilizando o teste *T-Student*, e testes não paramétricos como o teste de *Kruskal-Wallis* ou o teste de *Mann-Whitney-Wilcoxon* usado para testar a heterogeneidade de duas amostras ordinais.

Quanto à avaliação da expressão do gene *ALP*, realizou-se a comparação entre condições com o teste *1-sample T-test* quando se verificava uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e quando o contrário se verificava realizou-se o teste de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. De seguida realizaram-se comparações múltiplas entre grupos experimentais utilizando testes

não paramétricos como o teste de *Kruskal-Wallis* usado para testar a heterogeneidade de duas amostras ordinais.

Relativamente à avaliação da formação dos depósitos de cálcio através do ensaio do *Alizarin Red S*, realizou-se a comparação entre condições com o teste *T-Student* quando se verificava uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias, e quando o contrário se verificava foi realizado o teste de *Mann-Whitney-Wilcoxon*. De seguida realizaram-se comparações múltiplas entre grupos experimentais utilizando testes não paramétricos como o teste de *Kruskal-Wallis* usado para testar a heterogeneidade de duas amostras ordinais.

Corrigiram-se todas as comparações múltiplas segundo o método de *Bonferroni* e foi considerado um valor de significância de 5% para todas as comparações.

Resultados

Tal como descrito nos materiais e métodos, e antes da exposição das culturas celulares aos meios condicionados, foi efetuada a avaliação dos pH dos mesmos. O ajuste deste pH não foi efetuado, tal como o recomendado pela norma ISO.

Meios condicionados

Após a obtenção dos meios condicionados, efetuou-se a medição do pH dos mesmos. Estes procedimentos realizaram-se para todos os materiais de estudo e para todas as concentrações usadas. Os resultados desta medição estão representados na Tabela 2.

Como se pode observar na Tabela 2, os valores de pH dos meios condicionados obtidos com todos os biomateriais e para todas as concentrações estão no espectro alcalino da escala. O valor de pH máximo medido foi de $10,90 \pm 1,30$ para WhiteProRoot[®]MTA na concentração 100% enquanto o valor mínimo foi de $7,93 \pm 0,31$ para o Biodentine[™] na concentração de 6,25%. Para cada biomaterial, o pH diminui com a diminuição da concentração do meio condicionado, aproximando-se nas concentrações mais baixas de valores perto do pH neutro.

Tabela 2: Valores de pH para cada material em cada concentração. Os valores expressos são a média de pelo menos três medições de meios condicionados diferentes e desvio padrão. (MED- média; DP – desvio padrão)

Concentração	Life®	WhiteProRoot® MTA	Biodentine™
	MED±DP	MED±DP	MED±DP
100%	10,51±0,64	10,90±1,30	10,82±0,76
50%	9,01±0,42	9,26±0,37	8,70±0,60
25%	8,60±0,27	8,43±0,64	8,18±0,58
12.50%	8,27±0,29	8,22±0,51	8,03±0,42
6.25%	8,10±0,32	8,07±0,46	7,93±0,31

Os diferentes meios condicionados com os vários biomateriais nas várias concentrações apresentaram valores de pH semelhantes entre si havendo, no entanto, algumas variações. Para as concentrações de 100% e de 50%, o WhiteProRoot® MTA apresentou os valores mais elevados de pH. Nas concentrações de 25%, de 12,5% e de 6,25%, o Life® apresentou os valores mais elevados de pH. O Biodentine™ revelou sempre os valores mais baixos de pH para todas as concentrações, exceto na concentração de 100%, cujo valor mais baixo é referente ao Life®.

Estudos de citotoxicidade

Para se efetuar a planificação dos estudos de citotoxicidade, foi previamente calculada a tempo de duplicação da linha celular MDPC-23. O tempo de duplicação obtido traduz uma média de 6 ensaios e foi de $17,48 \pm 4,25$ horas para a linha celular MDPC-23. Procedeu-se, de seguida, aos estudos de citotoxicidade.

Atividade metabólica

Os resultados experimentais da avaliação da atividade metabólica das células da linha MDPC-23, obtidos pelo ensaio do MTT, estão representados na Figura 13.

De um modo geral, o tratamento com o Life[®] determinou a diminuição significativa da atividade metabólica quando as culturas celulares foram expostas a meios condicionados com concentrações iguais ou superiores a 12,5%. No caso do Biodentine[™] também se verificou uma diminuição estatisticamente significativa da atividade metabólica quando as células foram incubadas com a maior concentração estudada. Pelo contrário o WhiteProRoot[®] MTA não determinou alterações significativas da atividade metabólica celular, observando-se sempre valores superiores a 75,97±5,32%.

As culturas celulares submetidas aos meios condicionados com Life[®] apresentaram uma diminuição muito acentuada da atividade metabólica tanto após incubação durante 120 horas, como durante 72 horas ou 24 horas.

Para a exposição à concentração de 100%, a atividade metabólica foi significativamente reduzida para 3,10±0,95% ($p<0,001$) após 24 horas de incubação e atingiu valores de 0,90±0,23% ($p<0,001$) após 72 horas de incubação e de 0,67±0,21% ($p<0,001$) após 120 horas de incubação.

Para o tratamento com os meios condicionados com esta concentração verificou-se ainda que a atividade metabólica das culturas celulares incubadas durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 72 horas ($p<0,05$) e à das expostas durante 120 horas ($p<0,01$).

O tratamento com os meios condicionados com Life[®] na concentração de 50% determinou a redução da atividade metabólica para 1,71±0,40% ($p<0,001$) após 24 horas de incubação, para 0,63±0,14% ($p<0,001$) após 72 horas de incubação e para 0,56±0,21% ($p<0,001$) após 120 horas de incubação. Adicionalmente, para o tratamento com os meios condicionados com esta concentração verificou-se que a atividade metabólica das culturas celulares expostas ao composto durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 72 horas ($p<0,05$) e durante 120 horas ($p<0,05$).

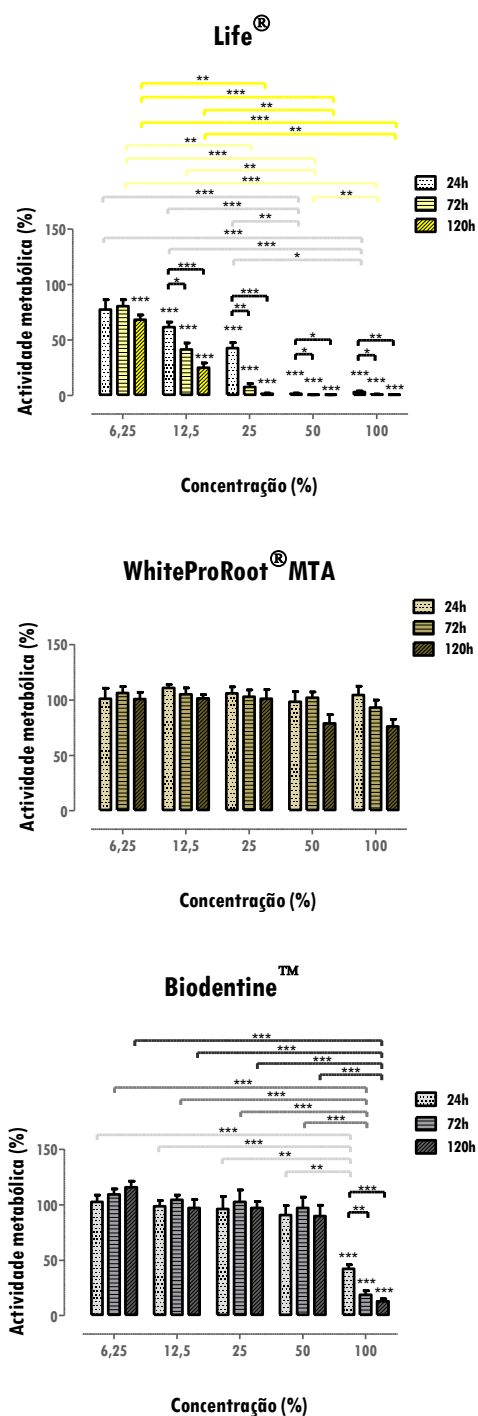


Figura 13: Atividade metabólica das células MDPC-23, quando submetidas ao tratamento com os meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™, após 24, 72 e 120 horas. Os resultados representam a média e erro padrão de 6 ensaios duplicados independentes. As diferenças significativas em relação ao controle, entre condições ou entre tempos de estudo, estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

O tratamento com os meios condicionados com Life[®] na concentração de 25% determinou a redução da atividade metabólica para $42,67 \pm 4,90\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $7,74 \pm 2,93\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $1,55 \pm 0,73\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. Adicionalmente, para o tratamento com os meios condicionados com esta concentração verificou-se que a atividade metabólica das culturas celulares expostas ao composto durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 72 horas ($p < 0,01$) e durante 120 horas ($p < 0,001$).

O tratamento com os meios condicionados com Life[®] na concentração de 12,5% determinou a redução da atividade metabólica para $61,65 \pm 4,68\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $41,42 \pm 6\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $25,17 \pm 4,14\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. Adicionalmente, para o tratamento com esta concentração verificou-se que a atividade metabólica das culturas celulares expostas ao composto durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 72 horas ($p < 0,05$) e durante 120 horas ($p < 0,001$).

Nas culturas celulares submetidas ao tratamento com o Life[®] numa concentração 6,25% apenas se verificou uma redução significativa da atividade metabólica para $68,42 \pm 4,28\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. Alguns aspetos relevantes sobressaíram quando se fez a comparação entre as culturas celulares submetidas a diferentes concentrações dos meios condicionados com o biomaterial Life[®] mas com o mesmo tempo de incubação.

Assim, para as culturas celulares expostas ao meio condicionado com este biomaterial, durante 24 horas, observou-se que a atividade metabólica das mesmas com a concentração de 100% foi inferior à obtida com a concentração de 25% ($p < 0,05$), à obtida com a concentração de 12,5% ($p < 0,001$) e à obtida com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Do mesmo modo, a atividade metabólica das culturas celulares expostas ao meio condicionado com Life[®] na concentração de 50% foi significativamente inferior à obtida com a concentração de 25% ($p < 0,01$) e à obtida com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$).

Resultados idênticos para a atividade metabólica das culturas celulares foram obtidos após 72 horas de exposição aos meios condicionados com o biomaterial Life[®] na concentração de 100% que foi inferior à obtida com a concentração de 50% ($p < 0,01$) e à obtida com a

concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Também, a atividade metabólica das culturas celulares expostas ao meio condicionado com a concentração de 50% foi inferior à obtida com a concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à obtida com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$). O mesmo se verificou quando as culturas foram expostas ao meio condicionado com a concentração de 25% em comparação com as da concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

Simultaneamente, às 120 horas observou-se que a atividade metabólica das culturas celulares expostas aos meios condicionados com a concentração de 100% foi inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Também, a atividade metabólica das culturas celulares submetidas aos meios condicionados com a concentração de 50% foi inferior à das submetidas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das submetidas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). O mesmo se verificou quando as culturas foram expostas aos meios condicionados na concentração de 25%, em comparação com as da concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

O tratamento com os meios condicionados com Biodentine™ na concentração de 100% determinou uma redução da atividade metabólica para $37,6 \pm 8\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $19 \pm 6,6\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $11,4 \pm 5\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. O tratamento com os meios condicionados na concentração referida permitiu verificar que a atividade metabólica das culturas celulares expostas durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 72 horas ($p < 0,01$) e durante 120 horas ($p < 0,001$).

A comparação entre as culturas celulares submetidas a diferentes concentrações de meios condicionados com o biomaterial Biodentine™, para um mesmo tempo de incubação, salientou ainda alguns aspetos relevantes. Assim, para as culturas celulares expostas a meios condicionados com este biomaterial durante 24 horas, observou-se que a atividade metabólica com concentração de 100% foi inferior à das expostas à concentração de 50% e de 25% ($p < 0,01$), assim como à das expostas à concentração de 12,5% e de 6,25% ($p < 0,001$). Do mesmo modo, nas culturas celulares expostas ao meio condicionado com Biodentine™ durante 72 horas e 120 horas observou-se que quando a concentração foi de 100% a atividade

metabólica foi estatisticamente inferior à das expostas à concentração de 50%, de 25%, de 12,5% e de 6,25% ($p < 0,001$).

A atividade metabólica foi, igualmente, avaliada por comparações múltiplas entre os diferentes compostos considerando a mesma concentração nos diferentes tempos de estudo.

Assim, após 24 horas de incubação com os meios condicionados com os vários biomateriais na concentração 100% verificou-se uma redução da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®] quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,01$), e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). No mesmo período de incubação, mas com concentrações de 50%, verificou-se uma redução da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Ainda após 24 horas de incubação com os meios condicionados com os vários biomateriais na concentração de 25%, observou-se uma redução da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®] quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,01$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Da mesma forma, após 24 horas de incubação com os meios condicionados com os referidos biomateriais na concentração de 12,5%, observou-se uma redução da atividade metabólica das culturas submetidas ao Life[®] quando comparadas com aquelas submetidas ao Biodentine[™] e ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Nas culturas celulares expostas à concentração de 6,25%, após 24 horas de incubação, apenas se verificou a redução da atividade metabólica com o Life[®] em relação ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$).

Após 72 horas de incubação dos meios condicionados com os biomateriais na concentração de 100%, verificou-se uma redução significativa da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®] quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,01$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$), e uma maior atividade metabólica das culturas celulares expostas ao WhiteProRoot[®]MTA quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,05$). No mesmo período de incubação, para os meios condicionados com as concentrações de 50%, verificou-se uma redução significativa da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®] quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Ainda, após 72 horas de incubação para os meios

condicionados com os biomateriais na concentração de 25%, observou-se uma redução significativa da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Da mesma forma, após 72 horas de incubação com os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 12,5%, observou-se uma redução significativa da atividade metabólica das culturas submetidas ao Life[®] quando comparadas com a das submetidas ao Biodentine[™] e ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Nas culturas celulares expostas aos meios condicionados com os biomateriais na concentração de 6,25%, após 72 horas de incubação, verificou-se uma redução com significado estatístico da atividade metabólica com o Life[®] relativamente à obtida com o Biodentine[™] ($p < 0,01$) ou com o WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$).

A atividade metabólica das culturas celulares expostas aos meios condicionados com os biomateriais após 120 horas de incubação apresentou diferenças da mesma ordem de grandeza que às obtidas após 72 horas, isto é, diferenças com o mesmo significado estatístico com exceção apenas para a redução significativa da atividade metabólica das culturas celulares expostas ao Life[®] com uma concentração de 6,25%, quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] na mesma concentração ($p < 0,001$).

Viabilidade Celular

Os resultados experimentais da viabilidade celular das células da linha MDPC-23 submetida aos meios condicionados com os três biomateriais de interesse, obtidos pelo ensaio do SRB, estão representados na Figura 14.

De um modo geral, o tratamento com o meio condicionado com Life[®] determinou a diminuição significativa da viabilidade celular quando as culturas celulares foram expostas a qualquer uma das concentrações de estudo e para todos os tempos de incubação. No caso do meio condicionado com Biodentine[™] também se verificou uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular, quando as células foram incubadas com as concentrações de 100% e de 50% para todos os tempos. Pelo contrário, o meio condicionado com

WhiteProRoot[®]MTA não determinou alterações significativas da viabilidade celular, observando-se sempre valores superiores a $76,87 \pm 6,82\%$.

As culturas celulares submetidas ao meio condicionado com Life[®] apresentaram uma diminuição muita acentuada da viabilidade celular tanto após a incubação durante 24 horas, como durante 72 e durante 120 horas. Esta diminuição acentuada verificou-se com todas as concentrações ($p < 0,001$). Com o meio condicionado com a concentração de 100%, a viabilidade foi significativamente reduzida para $2,64 \pm 0,63\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $1,62 \pm 0,38\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $1,42 \pm 0,32\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. O tratamento com meio condicionado com Life[®] na concentração de 50% determinou a redução significativa da viabilidade celular para $4,34 \pm 1,01\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $2,20 \pm 0,76\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $0,97 \pm 0,24\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação.

Para o tratamento com esta concentração verificou-se, ainda, que a viabilidade celular das culturas expostas ao composto durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 120 horas ($p < 0,01$).

O tratamento com o meio condicionado com Life[®] na concentração de 25% determinou, também, uma redução significativa da viabilidade celular para $36,11 \pm 3,35\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $2,60 \pm 0,89\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $1,98 \pm 0,75\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. Para o tratamento com esta concentração, verificou-se ainda, que a viabilidade celular das culturas expostas ao composto durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 72 horas ($p < 0,01$) e durante 120 horas ($p < 0,001$). O tratamento com o meio condicionado com Life[®] na concentração de 12,5% determinou a redução significativa da viabilidade celular para $55,13 \pm 4,56\%$ após 24 horas de incubação ($p < 0,001$), para $30,26 \pm 4,83\%$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $11,57 \pm 2,69\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. Para o tratamento com esta concentração, verificou-se que a viabilidade celular das culturas expostas ao composto durante 24 horas foi significativamente superior à das expostas durante 120 horas ($p < 0,001$) e, da mesma forma que a das culturas expostas durante 72 horas foi significativamente superior à das expostas durante 120 horas ($p < 0,05$).

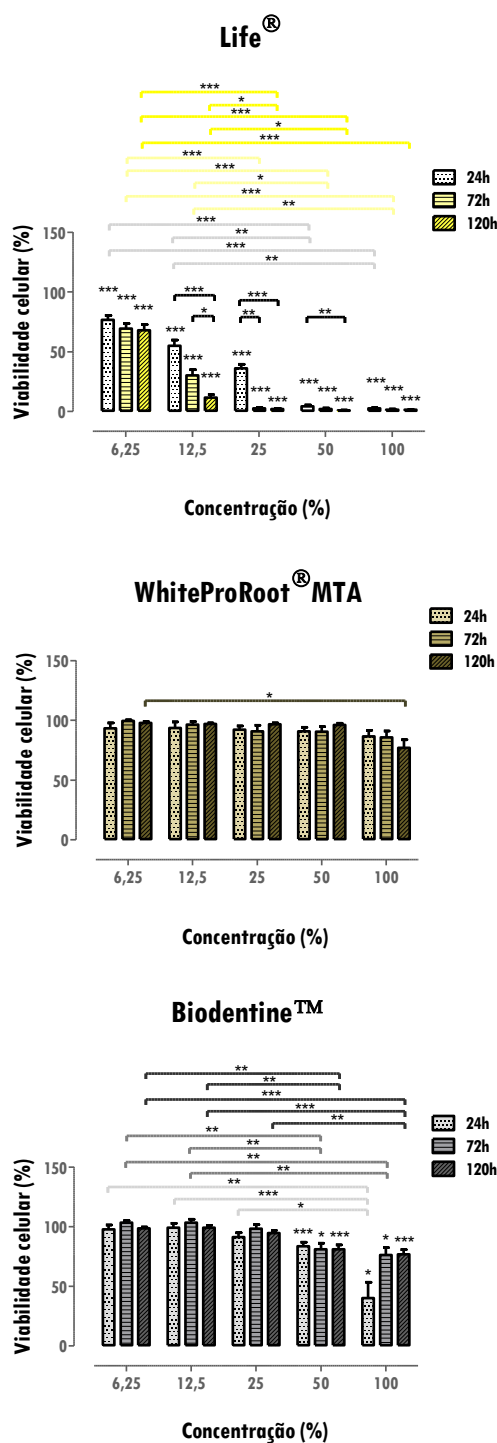


Figura 14: Viabilidade celular das células MDPC-23, quando submetidas ao tratamento com os meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™, após 24, 72 e 120 horas. Os resultados representam a média e erro padrão de 6 ensaios duplicados independentes. As diferenças significativas em relação ao controle, entre condições ou entre tempos de estudo estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

O tratamento com o meio condicionado com Life[®] na concentração 6,25% determinou uma redução significativa da viabilidade celular para $76,59 \pm 3,59\%$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $69,31 \pm 4,31$ ($p < 0,001$) após 72 horas de incubação e para $67,87 \pm 4,79$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação, não havendo diferenças entre os tempos de estudo.

A comparação entre os efeitos nas culturas celulares submetidas a diferentes concentrações do meio condicionado com o biomaterial Life[®], para o mesmo tempo de incubação, salientou ainda alguns aspetos relevantes. Assim, para as culturas celulares expostas a este meio condicionado durante 24 horas, observou-se que a viabilidade celular após exposição à concentração de 100% foi significativamente inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Do mesmo modo, a viabilidade das culturas celulares expostas ao meio condicionado com Life[®] na concentração de 50% foi significativamente inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Também às 72 horas se observou que a viabilidade das culturas celulares expostas ao meio condicionado na concentração de 100% foi inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Quanto à viabilidade das culturas celulares expostas ao meio condicionado na concentração de 50%, ela foi inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,05$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). O mesmo se verificou quando as células foram expostas ao meio condicionado na concentração de 25%, em comparação com as da concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Após 120 horas de incubação os resultados foram semelhantes, com a viabilidade das culturas celulares submetidas aos meios condicionados na concentração de 100% a ser estatisticamente inferior à das submetidas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$) e à das submetidas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Também a viabilidade das culturas celulares expostas aos meios condicionados na concentração de 50%, foi significativamente inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,05$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). O mesmo se verificou quando as culturas foram submetidas aos meios condicionados na concentração de 25%, em comparação com as concentrações de 12,5% ($p < 0,05$) e de 6,25% ($p < 0,001$).

Para as culturas celulares expostas ao tratamento com o meio condicionado com WhiteProRoot®MTA apenas se verificou que, quando a concentração foi de 100% e durante 120 horas, a viabilidade celular diminuiu, com significado estatístico, relativamente à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,05$).

O tratamento com o meio condicionado com Biodentine™ na concentração de 100% determinou uma redução significativa da viabilidade celular para $72,1 \pm 7,1\%$ ($p < 0,05$) após 24 horas de incubação, para $75,6 \pm 6,6\%$ ($p < 0,05$) após 72 horas de incubação e para $78,2 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação. O tratamento com o meio condicionado com Biodentine™ na concentração de 50% também determinou uma redução, com significado estatístico, da viabilidade celular para $80,8 \pm 5,4$ ($p < 0,001$) após 24 horas de incubação, para $81,9 \pm 7,5$ ($p < 0,05$) após 72 horas de incubação e para $86,5 \pm 3,9$ ($p < 0,001$) após 120 horas de incubação.

A comparação entre as culturas celulares submetidas a meio condicionado com diferentes concentrações do biomaterial Biodentine™ para o mesmo tempo de incubação, permite salientar mais alguns aspetos relevantes. Assim, para as culturas celulares expostas a este meio condicionado durante 24 horas, observou-se que a viabilidade celular com a concentração de 100% foi significativamente inferior às expostas à concentração de 25% ($p < 0,05$), às expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,001$) e às expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,01$). Da mesma forma, às 72 horas observou-se que a viabilidade das culturas celulares submetidas à concentração de 100% foi inferior, com significado estatístico, à das submetidas às concentrações de 12,5% ($p < 0,01$) e de 6,25% ($p < 0,01$). Também, a viabilidade das células expostas ao meio condicionado na concentração de 50%, foi estatisticamente inferior à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,01$). Após 120 horas de incubação observou-se que a viabilidade das culturas celulares expostas à concentração de 100% foi significativamente inferior à das expostas à concentração de 25% ($p < 0,01$), à das expostas à concentração de 12,5% ($p < 0,001$) e à das expostas à concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Também a viabilidade das culturas celulares submetidas à concentração de 50% foi inferior à das submetidas à concentração de 12,5% ($p < 0,01$) e à das submetidas à concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

A viabilidade celular foi, também, avaliada por comparações múltiplas entre os diferentes compostos com a mesma concentração nos diferentes tempos de estudo. Assim, após 24 horas de incubação com os meios condicionados com os vários biomateriais na concentração de 100%, verificou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Biodentine™, quando comparadas com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,05$). De forma semelhante e para o mesmo tempo e concentração, verificou-se redução da viabilidade das culturas celulares expostas ao meio condicionado com Life®, quando comparadas com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,01$). Para o mesmo tempo de incubação e para as concentrações de 50% verificou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao meio condicionado com Life®, quando comparadas com as expostas ao Biodentine™ ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,001$). Após 24 horas de incubação para os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 25%, observou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life® quando comparadas com as expostas ao Biodentine™ ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,001$). Da mesma forma, após 24 horas de incubação para os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 12,5%, observou-se redução significativa da viabilidade das culturas submetidas ao Life®, quando comparadas com aquelas submetidas ao Biodentine™ ($p < 0,001$) e quando comparadas com as submetidas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,001$). Nas culturas celulares expostas aos meios condicionados com os biomateriais na concentração de 6,25%, após 24 horas de incubação, verificou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life®, quando comparadas com as expostas ao Biodentine™ ($p < 0,01$) e com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,05$). Assim, após 72 horas de incubação com os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 100%, verificou-se redução estatisticamente significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life®, quando comparadas com as expostas ao Biodentine™ ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,01$). Para o mesmo tempo de incubação e para as concentrações de 50%, verificou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao meio condicionado com Life®, quando comparadas com as expostas ao Biodentine™ ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot®MTA ($p < 0,001$). Após 72 horas de incubação e para os meios

condicionados com os biomateriais na concentração de 25%, observou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Da mesma forma, após 72 horas de incubação, para os meios condicionados com os três biomateriais na concentração de 12,5%, observou-se redução significativa da viabilidade das culturas submetidas ao Life[®], quando comparadas com as submetidas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nas culturas celulares expostas aos meios condicionados com os biomateriais na concentração de 6,25%, após 72 horas de incubação, verificou-se redução significativa da viabilidade com o Life[®] relativamente ao Biodentine[™] ($p < 0,05$) e, também, em relação ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Da mesma forma, após 120 horas de incubação com os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 100%, verificou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). No mesmo tempo de incubação e para os meios condicionados nas concentrações de 50%, verificou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,01$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Após 120 horas de incubação com os meios condicionados com os três biomateriais na concentração de 25% observou-se redução significativa da viabilidade das culturas celulares expostas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Após 120 horas de incubação com os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 12,5%, observou-se, também, redução significativa da viabilidade das culturas submetidas ao Life[®], quando comparadas com as expostas ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nas culturas celulares expostas aos meios condicionados com os biomateriais na concentração de 6,25%, após 120 horas de incubação, verificou-se igualmente a redução significativa da viabilidade com o Life[®] relativamente ao Biodentine[™] ($p < 0,001$) e com o WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$).

Morte celular

Para caracterizar as vias de morte celular induzidas pela exposição aos meios condicionados com as diferentes concentrações dos biomateriais em análise realizaram-se vários estudos, nomeadamente, a avaliação da proliferação celular por contagem das células, a avaliação da integridade da membrana citoplasmática e a avaliação do potencial de membrana mitocondrial.

Proliferação celular

A contagem de células foi efetuada após 120 horas de incubação das culturas celulares com os meios condicionados pelos biomateriais de estudo com comparação com culturas celulares controlo. A média do número de células das várias culturas celulares revelam a proliferação celular neste período e nas condições descritas, e está expressa na Figura 15.

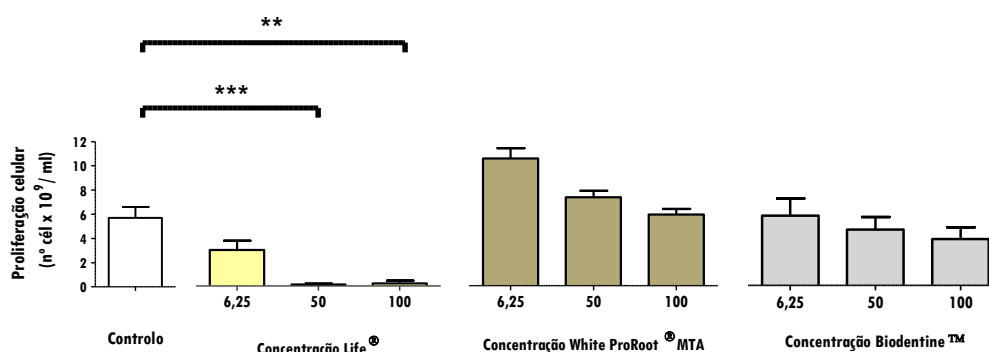


Figura 15: Resultados da proliferação celular, após 120 h de incubação com os meios condicionados pelos biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™ nas concentrações de 100%, 50% e 6,25% e, controlo. Os resultados expressam a média e o erro padrão de pelo menos 8 ensaios independentes.

De um modo geral, verificou-se que a proliferação das culturas celulares submetidas ao tratamento com o meio condicionado com Life® diminuiu em todas as concentrações testadas, sendo esta redução significativa nas concentrações de 100% ($p < 0,01$) e de 50% ($p < 0,001$), nas quais não se verificou praticamente nenhuma proliferação celular. No tratamento com a concentração de 6,25%, a proliferação das culturas celulares foi reduzida para cerca de metade

relativamente ao controlo. No tratamento com os meios condicionados com os biomateriais WhiteProRoot®MTA e Biodentine™, verificou-se que a proliferação das culturas celulares está na dependência da concentração de forma inversamente proporcional, isto é, quanto maior a concentração menor é a proliferação celular. No entanto, esta apenas se verificou diminuída no tratamento com as concentrações de 50% e de 100% com o Biodentine™. Tendo em conta os resultados, podemos dizer que os tratamentos das culturas celulares com o meio condicionado com Biodentine™ na concentração de 6,25% e com WhiteProRoot®MTA na concentração de 100%, mantêm a proliferação celular semelhante ao controlo. Por outro lado, o tratamento com o meio condicionado com WhiteProRoot®MTA nas concentrações de 50% e de 6,25% apresentou um aumento da proliferação das culturas celulares relativamente ao controlo.

Vias de morte celular

A viabilidade e o número de células em morte por apoptose, por apoptose tardia e por necrose, são influenciados pelos biomateriais Biodentine™ e Life® de um modo significativo e dependente da concentração do biomaterial, de uma forma mais evidente com o último. Com o WhiteProRoot®MTA não se verificam alterações na viabilidade e no tipo de morte celular relativamente ao controlo. Estes resultados, relativos ao tipo de morte e à viabilidade celular após 120 de exposição aos meios condicionados, podem ser observados na Figura 16.

Com o tratamento com o meio condicionado com Life® verificou-se redução significativa da população de células vivas que passou de $76,78 \pm 1,44\%$ na condição controlo para $9,62 \pm 4,53\%$ ($p < 0,001$) quando submetidas à concentração de 100% e para $7,14 \pm 1,80\%$ ($p < 0,001$) quando sujeitas à concentração de 50%. De modo concomitante, verificou-se um aumento das populações de células em apoptose e em apoptose tardia/necrose para as mesmas concentrações. Assim, na concentração de 100%, observou-se aumento significativo de células em apoptose que passaram de $6,57 \pm 1,50\%$ na condição controlo para $29,63 \pm 3,61\%$ ($p < 0,01$) na condição experimental e de células em apoptose tardia/necrose que passaram de $6,78 \pm 0,56\%$ na condição controlo para $59,25 \pm 5,60\%$ ($p < 0,001$) na condição experimental; da mesma forma, com a concentração de 50% verificou-se aumento significativo de células em

apoptose de $6,57 \pm 1,50\%$ na condição controlo para $35,43 \pm 8,6\%$ ($p < 0,001$) na condição experimental enquanto as células em apoptose tardia/necrose passaram de $6,78 \pm 0,56\%$ na condição controlo para $55,57 \pm 10,70\%$ ($p < 0,001$) na condição experimental. Por outro lado, as populações de células em necrose para a concentração de 100% diminuíram significativamente de $10 \pm 1,08\%$ na condição controlo para $2 \pm 0,56\%$ ($p < 0,01$) na condição experimental.

O tratamento com o meio condicionado com Life[®] na concentração de 6,25% não determinou alterações significativas, com exceção de aumento significativo da população de células em necrose que passaram de $10 \pm 1,08\%$ na condição controlo para $13,86 \pm 2,02\%$ ($p < 0,01$) na condição experimental.

De referir, ainda, que as populações de células em necrose das culturas celulares submetidas à concentração de 6,25%, foram superiores com significado estatístico à das submetidas à concentração de 100% ($p < 0,001$) e à das submetidas à concentração de 50% ($p < 0,01$).

No tratamento com o meio condicionado com Biodentine[™] verificou-se uma redução significativa da população de células vivas em todas as concentrações. Essa redução foi de $76,78 \pm 1,44\%$ na condição controlo para $54,71 \pm 5,23\%$ ($p < 0,01$) na concentração de 100%, para $56,86 \pm 3,47\%$ ($p < 0,01$) na concentração de 50% e para $56,60 \pm 4,62\%$ ($p < 0,05$) na concentração de 6,25%. No que concerne às populações em morte, não houve qualquer alteração das células em apoptose para todas as concentrações, mas, e de forma concomitante, houve aumento significativo das populações de células em apoptose tardia/necrose nas três concentrações de estudo. Assim, nas populações em apoptose tardia/necrose verificou-se aumento significativo de $6,78 \pm 0,56\%$ na condição controlo para $24,14 \pm 4\%$ ($p < 0,01$) na concentração de 100%, para $24 \pm 4,54\%$ ($p < 0,01$) na concentração de 50% e para $19,6 \pm 3,3\%$ ($p < 0,05$) na concentração de 6,25%. Nas populações em necrose houve algumas variações com aumento numas concentrações e diminuição noutras. Assim, as populações em necrose diminuíram significativamente de $10 \pm 1,08\%$ na condição controlo para $7,57 \pm 0,95\%$ ($p < 0,001$) na concentração de 100%, e para $8,85 \pm 1,44\%$ ($p < 0,001$) na concentração de 50%, enquanto que, na concentração de 6,25% as populações em necrose aumentaram significativamente para $15,8 \pm 2,70\%$ ($p < 0,01$).

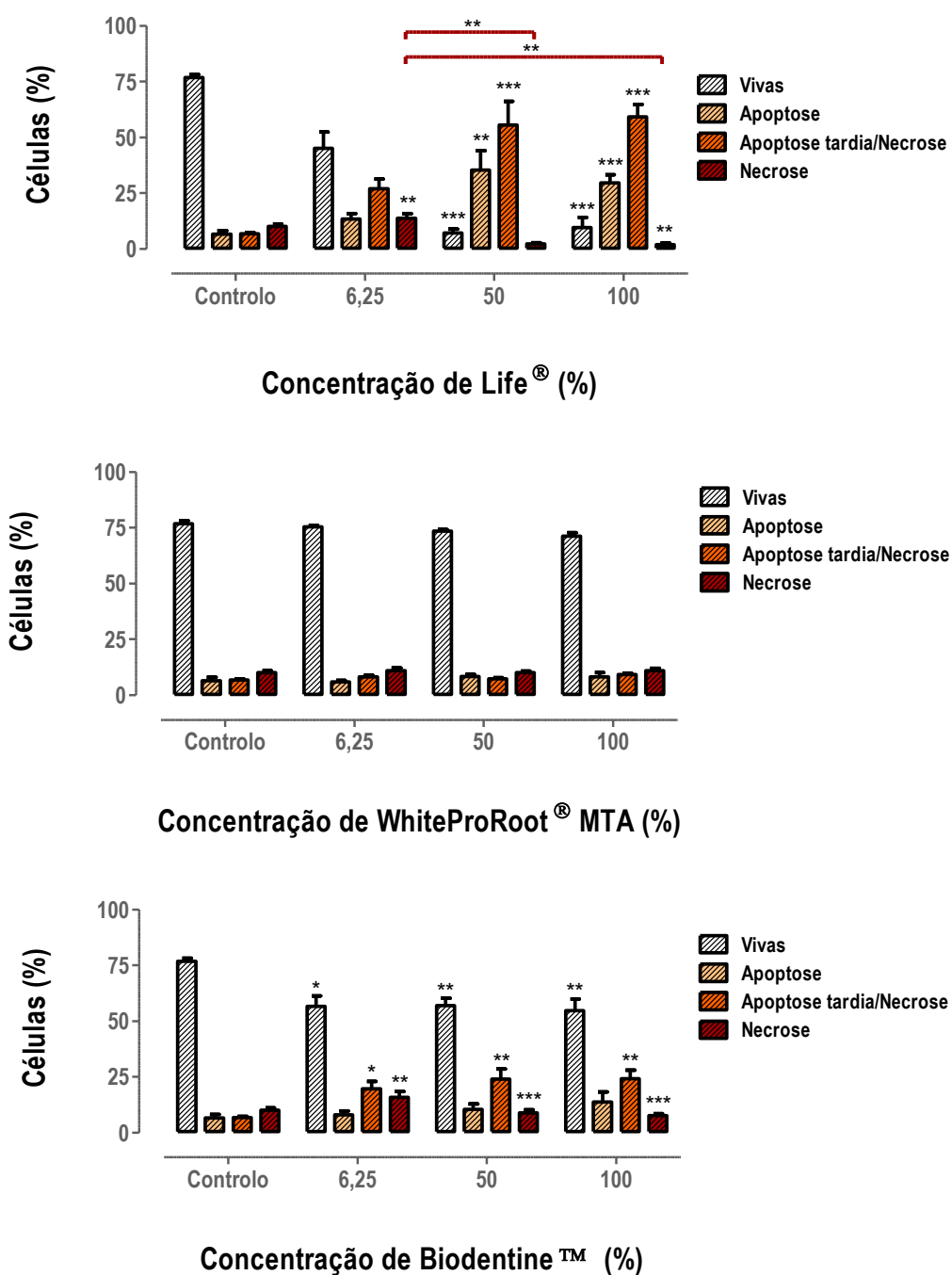


Figura 16: Viabilidade celular e tipos de morte nas células MDPC-23 submetidas ao tratamento com os meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™, após 120 horas de exposição. Os resultados estão representados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia ou necrose e em necrose. Os resultados representam a média e erro padrão de 6 ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo ou entre condições estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

A viabilidade celular e os tipos de morte foram, também, avaliados por comparações múltiplas entre os diferentes compostos. Assim, para o meio condicionado com a concentração de 100%, verificou-se redução, com significado estatístico, das populações de células vivas para as culturas celulares com o tratamento com o meio condicionado com Life[®], quando comparadas com as expostas ao tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Nas populações de células em apoptose verificou-se aumento significativo após tratamento com meio condicionado com Life[®], quando comparadas com o tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$) ou com Biodentine[™] ($p < 0,05$). Nas populações de células em apoptose tardia/necrose observou-se aumento significativo com o tratamento com meio condicionado com Life[®], quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Da mesma forma, verificou-se aumento significativo nestas populações quando foram tratadas com meio condicionado com Biodentine[™], quando comparadas com as tratadas com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nas populações de células em necrose verificou-se uma diminuição, com significado estatístico, com o tratamento com meio condicionado com Life[®], quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$) e com Biodentine[™] ($p < 0,05$). Para a concentração de 50% verificou-se redução significativa das populações de células vivas nas culturas celulares tratadas com o meio condicionado com Life[®], quando comparadas com as expostas ao tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Do mesmo modo, verificou-se uma diminuição estatística destas populações quando as culturas celulares foram tratadas com Biodentine[™], quando comparadas com as tratadas com o WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nas populações de células em apoptose verificou-se aumento significativo quando tratadas com Life[®] quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Nas populações de células em apoptose tardia/necrose observou-se aumento significativo quando tratadas com Life[®], quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Da mesma forma, verificou-se aumento significativo das populações tratadas com o Biodentine[™], quando comparadas com as tratadas com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Nas populações de células em necrose verificou-se diminuição estatística quando tratadas com o condicionado com Life[®], quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$) e com Biodentine[™] ($p < 0,05$). Para a

concentração de 6,25% verificou-se redução, com significado estatístico, das populações de células vivas nas culturas celulares com tratadas com meio condicionado com Life[®] quando comparadas com as expostas ao tratamento com o WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Da mesma forma, verificou-se diminuição significativa destas populações quando as culturas celulares foram tratadas com meio condicionado com Biodentine[™], quando comparadas com as tratadas com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nas populações de células em apoptose verificou-se aumento significativo quando tratadas com Life[®] quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Nas populações de células em apoptose tardia/necrose observou-se aumento significativo com o tratamento com Life[®], quando comparadas com o tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,001$). Da mesma forma verificou-se aumento, com significado estatístico, destas populações quando tratadas com meio condicionado com Biodentine[™], quando comparadas com as tratadas com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nas populações de células em necrose não se verificou qualquer alteração com significado estatístico, entre os meios condicionados com os três biomateriais nas suas diferentes concentrações.

Potencial de membrana mitocondrial

A disrupção do potencial de membrana mitocondrial, que constitui uma característica distintiva da apoptose, resulta no desacoplamento da cadeia respiratória e na libertação de citocromo C. O potencial da membrana mitocondrial foi perturbado como consequência da exposição aos meios condicionados com os três biomateriais como se pode observar na Figura 17.

Para o tratamento com meio condicionado com Life[®] verificou-se que o potencial de membrana mitocondrial foi perturbado na concentração de 6,25% pois passou de $2,53 \pm 0,21\%$ na condição controlo para $3,94 \pm 0,51\%$ na condição experimental não tendo, no entanto, significado estatístico.

Para o tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA, verificou-se que o potencial de membrana mitocondrial foi, de facto, perturbado significativamente pois passou de $2,53 \pm 0,21\%$ na condição controlo para $4,02 \pm 0,21\%$ ($p < 0,001$) na concentração de 50%, e para

$4,56 \pm 0,62\%$ ($p < 0,01$) na concentração de 100%. Ainda relativamente a este biomaterial, verificou-se que a relação monómeros/agregados aumentou significativamente nos tratamentos com a concentração de 100%, quando comparados com a concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

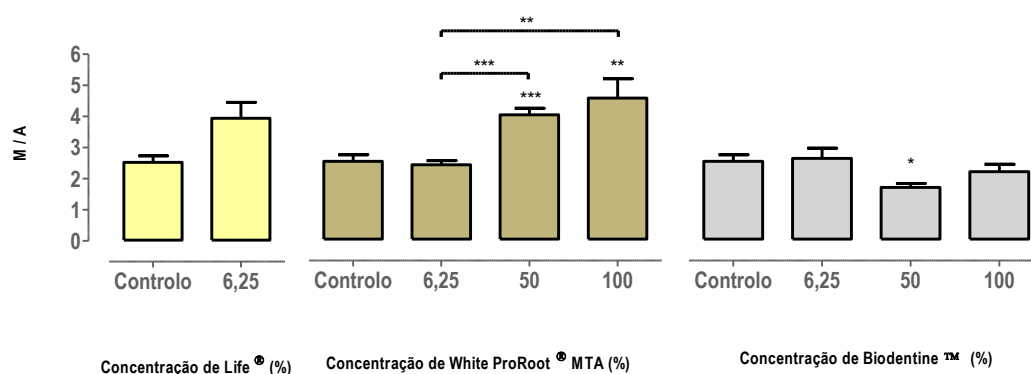


Figura 17: Potencial de membrana mitocondrial nas células MDPC-23 submetidas ao tratamento com meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™, após 120 horas de exposição. Os resultados representam a razão monómeros/agregados (M/A) para cada condição. A sonda JC-1 coexiste na forma monomérica ou agregada de acordo com o potencial de membrana mitocondrial. Os resultados representam a média e erro padrão de 8 ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo ou entre condições estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Da mesma forma, ocorre um aumento significativo desta relação nos tratamentos com a concentração de 50%, quando comparados com os tratamentos com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$).

No tratamento com meio condicionado com Biodentine™ com uma concentração de 50% verificou-se uma diminuição significativa da relação monómeros/agregados a qual passou de $2,53 \pm 0,21\%$ na condição controlo para $1,69 \pm 0,13\%$ ($p < 0,05$) na condição experimental.

Quando se compararam os resultados dos diversos compostos, observou-se uma diminuição significativa da relação monómeros/agregados das culturas celulares submetidas ao tratamento com Biodentine™ na concentração de 50%, quando comparado com as submetidas ao tratamento com WhiteProRoot® MTA na mesma concentração ($p < 0,001$). De um modo global, verifica-se que ocorreu uma disrupção do potencial de membrana mitocondrial com os meios

condicionados com as concentrações de 50% e de 100% do WhiteProRoot[®]MTA e na concentração de 50% do Biodentine[™].

Ciclo celular

De um modo geral, o ciclo celular foi pouco influenciado pelos meios condicionados com os três biomateriais como representado na Figura 18, sendo o WhiteProRoot[®]MTA aquele que provoca maiores alterações. Não foi possível efetuar a avaliação do ciclo celular com o meio condicionado com o biomaterial Life[®] nas concentrações de 50 e de 100%.

Relativamente às culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Life[®] observou-se um aumento significativo da população em fase G2/M de $13,22 \pm 1,13\%$ na condição controlo para $26,17 \pm 5,38\%$ ($p < 0,05$) na condição experimental.

O tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA apresentou alterações do ciclo celular com a exposição às concentrações mais elevadas, nomeadamente à concentração de 100%, onde se verificou aumento significativo da percentagem de células na fase S, que passaram de $23,72 \pm 0,7\%$ na condição controlo para $27,72 \pm 0,47\%$ ($p < 0,01$). Com o meio condicionado na concentração de 50% verificou-se um aumento significativo de células da fase S que passaram de $23,72 \pm 0,7\%$ na condição controlo para $27,04 \pm 0,40\%$ ($p < 0,01$) na condição experimental assim como diminuição das células na fase G2/M que passaram de $12,56 \pm 0,67\%$ na condição controlo para $10,16 \pm 0,21\%$ ($p < 0,01$) na condição experimental. Estas alterações com as concentrações mais altas são ainda mais evidentes quando se observaram as diferenças significativas entre a concentração 6,25% e as concentrações de 50% e de 100%. Assim, verificaram-se alterações significativas na percentagem de células na fase Pré-G0 entre a concentração de 6,25% e a concentração de 50% ($p < 0,01$), na fase G0/G1 entre a concentração de 6,25% e a de 100% ($p < 0,05$) e na fase S entre a concentração de 6,25% e as concentrações de 50% ($p < 0,01$) e a de 100% ($p < 0,01$).

O tratamento com meio condicionado com Biodentine[™] apresentou alterações, apenas, com a exposição à concentração mais elevada, com a qual se verificaram alterações significativas da percentagem de células nas fases Pré-G0, G0/G1 e G2/M. Na fase Pré-G0 verificou-se aumento

significativo de $3,17 \pm 0,47\%$ na condição controlo para $10 \pm 1,92\%$ ($p < 0,01$) na condição experimental. Em consequência, na fase G0/G1 verificou-se diminuição significativa de $63,44 \pm 0,98\%$ na condição controlo para $48,4 \pm 5,29\%$ ($p < 0,05$) na condição experimental, acompanhada por aumento significativo na fase G2/M cuja percentagem de células passou de $12,56 \pm 0,67\%$ na condição controlo para $21 \pm 1,7\%$ ($p < 0,001$) na condição experimental. Estas alterações na fase G2/M são também significativamente diferentes entre a concentração de 100% e de 6,25% ($p < 0,001$).

As comparações múltiplas entre os meios condicionados revelam, essencialmente, diferenças entre o WhiteProRoot[®]MTA e os outros dois biomateriais. Nos tratamentos com meios condicionados dos biomateriais na concentração de 100%, verificou-se que os efetuados com Biodentine[™], a percentagem de células nas fases Pré-G0 ($p < 0,01$) e G2/M ($p < 0,05$) estão aumentadas significativamente quando comparada com a nos tratamentos com WhiteProRoot[®]MTA. Da mesma forma, nas culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Life[®] verificou-se que a percentagem de células na fase G2/M está aumentada significativamente, quando comparada com a das culturas submetidas ao tratamento com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,05$). Nos tratamentos com a concentração de 50% dos meios condicionados com os biomateriais, verificou-se que naqueles em que as culturas celulares foram submetidas ao Biodentine[™], a percentagem de células nas fases Pré-G0 ($p < 0,01$) e G2/M ($p < 0,01$) estão estatisticamente aumentadas enquanto que a na fase S ($p < 0,01$) está diminuída, quando comparadas com a das culturas submetidas aos tratamentos com White ProRoot[®]MTA. Nos tratamentos com a concentração de 6,25% dos meios condicionados com biomateriais, quando se compararam os tratamentos efetuados com Biodentine[™] e com WhiteProRoot[®]MTA, verificou-se que apenas existiam diferenças estatísticas na percentagem de células na fase Pré-G0 ($p < 0,01$) com aumento significativo desta fase nos tratamentos com o primeiro, quando comparados com o segundo biomaterial. Da mesma forma, nos tratamentos com a mesma concentração, verificou-se que naqueles em que as culturas celulares foram submetidas ao meio condicionado com Biodentine[™], a percentagem de células em fase S ($p < 0,05$) estava significativamente aumentada enquanto na fase G2/M ($p < 0,05$) estava diminuída, quando comparadas com as mesmas fases nos tratamentos com Life[®].

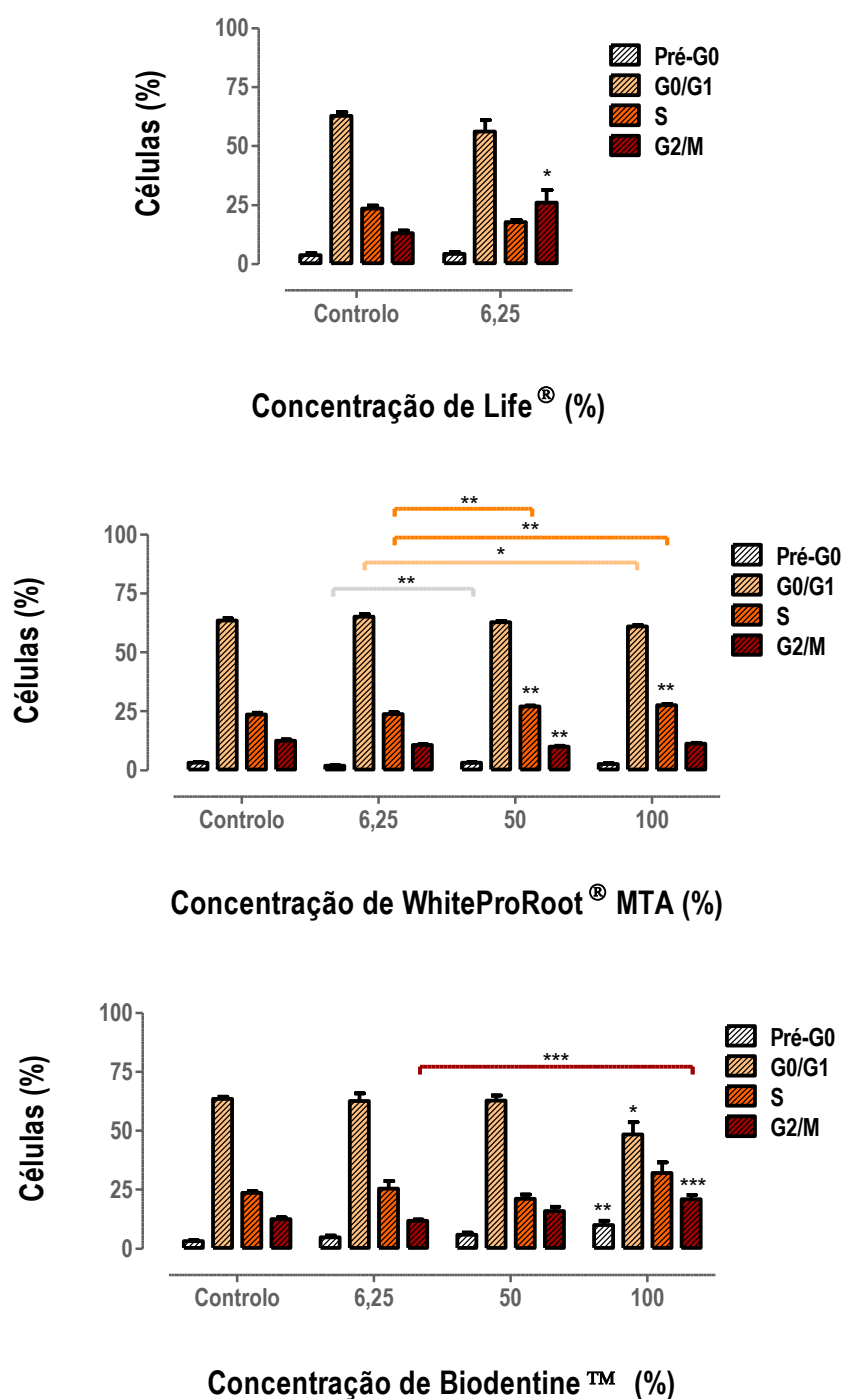


Figura 18: Ciclo celular nas células MDPC-23 submetidas ao tratamento com os meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™, após 120 horas de exposição. Os resultados estão representados na forma de percentagem de células nas fases pré-G0, G0/G1, S e G2/M. Os resultados representam a média e erro padrão de 5 ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo ou entre condições estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Ainda, nos tratamentos com a mesma concentração, se verificou que os efetuados com culturas celulares submetidas ao tratamento com Life[®] apresentavam significativo aumento da percentagem de células na fase Pré-G0 ($p < 0,05$) e da fase G2/M ($p < 0,001$) e diminuição na fase S ($p < 0,01$), quando comparadas com as culturas celulares submetidas ao tratamento com White ProRoot[®]MTA.

Stresse oxidativo

A produção intracelular de peróxidos, representada na Figura 19, foi avaliada 120 horas após de tratamento com os meios condicionados com os biomateriais. De um modo geral verificou-se um aumento significativo das espécies reativas de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*-ROS), com o tratamento com os meios condicionados com os biomateriais White ProRoot[®]MTA e Biodentine[™] nas concentrações mais elevadas e com o Life[®] na concentração de 6,25%.

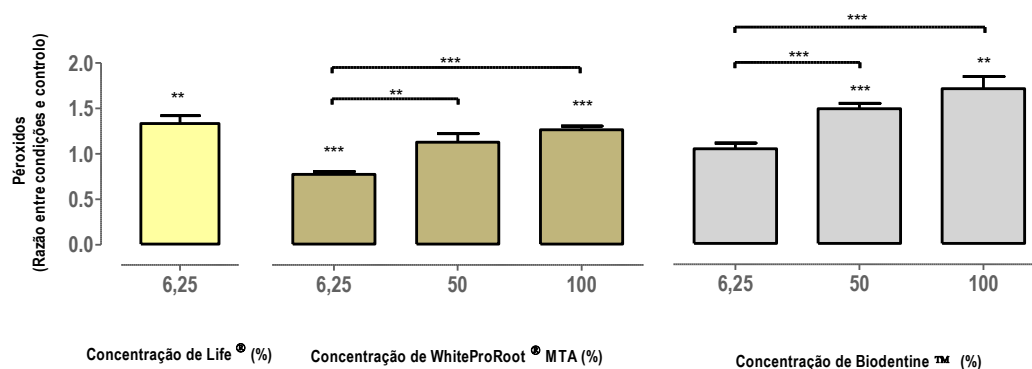


Figura 19: Produção intracelular de peróxidos nas células MDPC-23 submetidas ao tratamento com meios condicionados com os biomateriais Life[®], WhiteProRoot[®]MTA e Biodentine[™], após 120 horas de exposição. Os resultados são apresentados sob a forma de variação em relação a culturas celulares controlo. Os gráficos representam a média e erro padrão de 7 ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo ou entre condições estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Nas culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Life[®] na concentração de 6,25% verificou-se aumento significativo da produção de peróxidos para $1,33 \pm 0,09$ ($p < 0,01$), relativamente ao controlo.

No tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA observaram-se alterações na produção de peróxidos com todas as concentrações em estudo, embora se tenha revelado apenas significativo com a concentração de 6,25% que diminuiu para $0,76 \pm 0,03$ ($p < 0,001$) e com a concentração de 100% que aumentou para $1,27 \pm 0,04$ ($p < 0,001$). Ainda, relativamente a este biomaterial verificou-se que a produção de peróxidos aumentou significativamente nos tratamentos com a concentração de 100%, quando comparados com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Da mesma forma, ocorreu aumento significativo desta relação nos tratamentos com a concentração de 50%, quando comparados com os tratamentos com a concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

No tratamento com meio condicionado com Biodentine[™] observou-se aumento da produção de peróxidos com todas as concentrações em estudo, embora se tenha revelado apenas significativo com a concentração de 50% que aumentou para $1,49 \pm 0,06$ ($p < 0,001$) e com a concentração de 100% que aumentou para $1,71 \pm 0,13$ ($p < 0,01$). Ainda, relativamente a este biomaterial verificou-se que a produção de peróxidos aumentou significativamente com os tratamentos com a concentração de 100%, quando comparados com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$). Da mesma forma, ocorreu aumento desta relação com os tratamentos com a concentração de 50%, quando comparados com os tratamentos com a concentração de 6,25% ($p < 0,001$).

Quando verificadas as comparações entre compostos, observou-se um aumento significativo da produção de peróxidos nas culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Biodentine[™] na concentração de 100%, quando comparado com as submetidas ao tratamento com WhiteProRoot[®]MTA na mesma concentração ($p < 0,05$). Nas culturas submetidas aos biomateriais na concentração de 50% verificou-se aumento significativo da produção de peróxidos com meio condicionado com Biodentine[™], quando comparado com WhiteProRoot[®]MTA ($p < 0,01$). Nos tratamentos com os meios condicionados na concentração de 6,25% dos biomateriais, quando se compararam os tratamentos efetuados com

Biodentine™ e com Life®, verificou-se que existiam diferenças estatísticas na produção de peróxidos com uma diminuição destes nos tratamentos com o primeiro, quando comparados com o segundo biomaterial ($p < 0,01$). Da mesma forma, nos tratamentos com a mesma concentração, verificou-se que naqueles em que as culturas celulares foram submetidas ao WhiteProRoot® MTA a produção de peróxidos diminuiu significativamente quando comparado com as submetidas ao tratamento com Life® ($p < 0,001$).

Morfologia celular

O painel de imagens apresentado na Figura 20 corresponde às células na condição controlo e após exposição aos meios condicionados com cada um dos materiais de estudo, na concentração selecionada para este ensaio.

A morfologia celular da linha MDPC-23 pode ser observada na Figura 20. As células desta linha, na condição controlo, apresentam uma forma estrelar com núcleo central. Verificou-se uma manutenção da morfologia celular com a exposição aos meios condicionados com Biodentine™ ou com WhiteProRoot® MTA. As lâminas destes materiais revelam, ainda, o aparecimento de pequenas partículas coradas de violeta escuro que são sedimentos dos meios condicionados dos biomateriais, e que se encontram situadas entre as células, junto às membranas citoplasmáticas e até dentro do citoplasma. Assim, a avaliação qualitativa efetuada através da observação detalhada das imagens, não revelou diferenças morfológicas das células entre estes dois biomateriais.

Por outro lado, nas culturas celulares submetidas ao meio condicionado com Life® observou-se uma alteração profunda da morfologia celular, com a perda da forma estrelar e com o aparecimento de vacuolização no citoplasma. A avaliação efetuada através da observação detalhada das imagens revelou, ainda, uma modificação da membrana citoplasmática na maioria das células, com a observação de uma contração da mesma, sendo este o desenho morfológico típico de uma célula em apoptose e necrose.

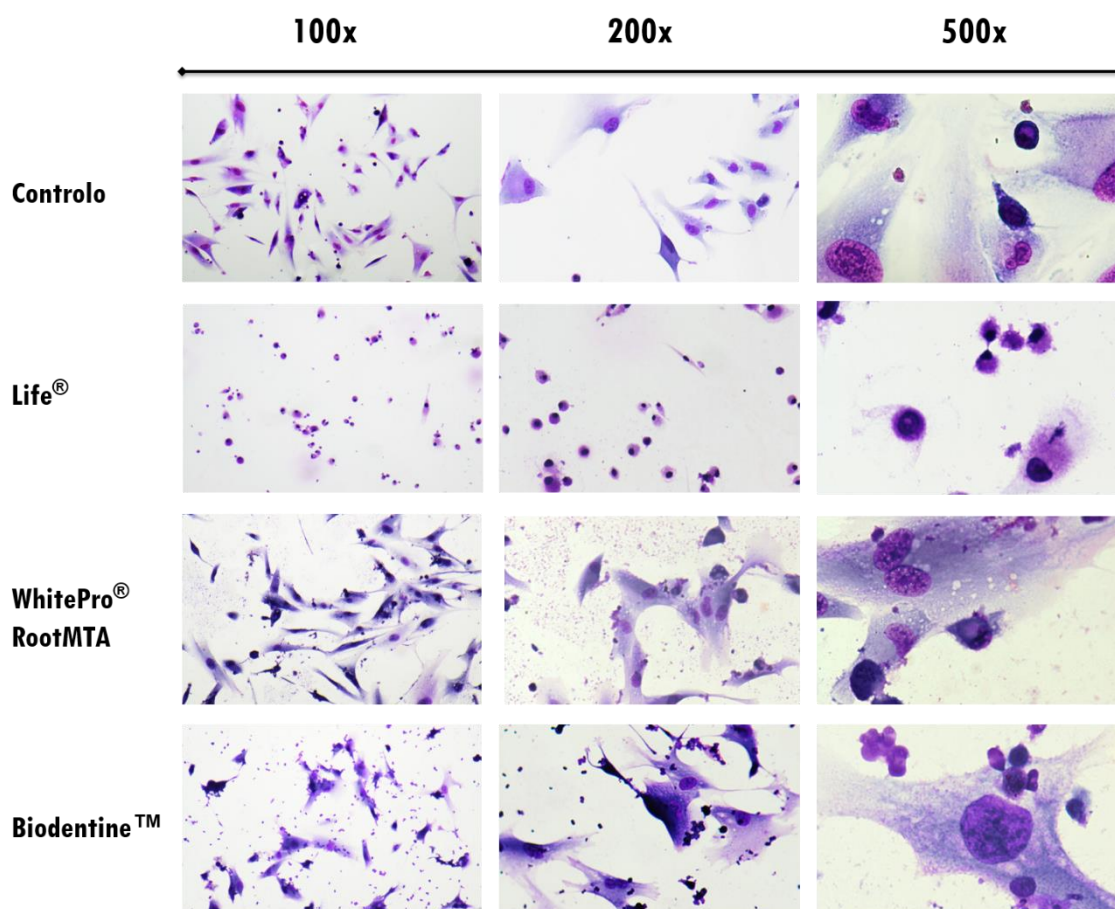


Figura 20: Imagens de lamelas de células em cultura, coradas com *May-Grünwald Giemsa*, da linha MDPC-23 quando submetidas aos tratamentos com meios condicionados com os biomateriais de estudo na concentração de 50%. O grupo controlo representa células em cultura em DMEM com 10% de FBS. As imagens da coluna à esquerda foram obtidas com uma ampliação 100x, as imagens da coluna central foram obtidas com uma ampliação 200x e as imagens da coluna à direita foram obtidas com uma ampliação 500x. Estes ensaios foram realizados em duplicado.

Diferenciação celular

Fosfatase alcalina – ensaio enzimático

Os painéis de imagens apresentados na Figura 21, Figura 22, Figura 23 e Figura 24 correspondem a células na condição controlo e após terem sido sujeitas aos meios condicionados com cada um dos biomateriais em estudo com as duas concentrações selecionadas para este ensaio.

A marcação por fluorescência da fosfatase alcalina, proteína sintetizada pelas células odontoblásticas, pode ser observada no painel de imagens representado na Figura 21. Pela avaliação das imagens do controlo verificou-se que a linha MDPC-23 expressa a fosfatase alcalina, mas com baixa intensidade, como se observa pela marcação de cor verde dispersa em cerca de 2% das células, evidenciada na figura do centro. A marcação *Hoechst* positiva, marcação do núcleo celular, também se verificou nas culturas celulares em cerca de 100% das células.

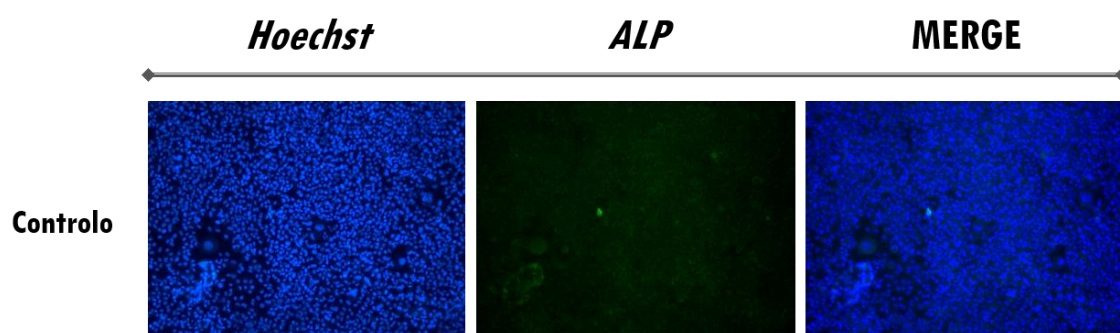


Figura 21: Imagens de células em cultura, coradas com *AP Live Stain* (verde) e *Hoechst 33252* (azul), da linha MDPC-23 quando submetidas a DMEM com 10% de FBS. As imagens foram obtidas com uma ampliação 100X. As imagens de microscopia de fluorescência obtidas foram sobrepostas através da função MERGE com o *software Image J* para sobreposição de imagens através da função MERGE.

Nas culturas celulares expostas ao tratamento com meio condicionado com Life[®] (Figura 22) verificou-se uma marcação verde dispersa em cerca de 3% das células presentes após terem sido sujeitas à concentração de 6,25% e em cerca de 10% das células após exposição à concentração de 50%. A comparação destas imagens com o controlo revelou um ligeiro aumento da síntese de ALP com este biomaterial, principalmente na concentração de 50%.

Nas culturas celulares submetidas ao meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA (Figura 23) com a concentração de 6,25% verificou-se a marcação positiva das células para a ALP, com um padrão ligeiramente aumentado em relação ao Life[®] e ao controlo, dispersa em cerca de 7% das células.

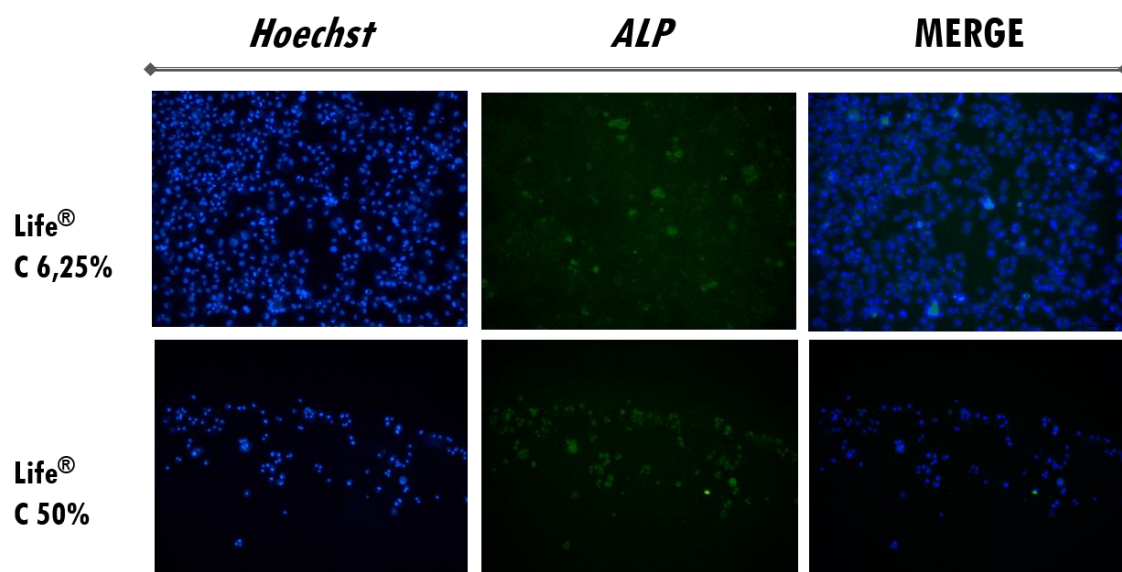


Figura 22: Imagens de células em cultura, coradas com *AP Live Stain* (verde) e *Hoechst 33252* (azul), da linha MDPC-23 quando submetidas ao tratamento com meio condicionado com o biomaterial Life[®] nas concentrações de 50% e de 6,25%. Todas foram obtidas com uma ampliação 100X. As imagens de microscopia de fluorescência obtidas foram sobrepostas através da função MERGE com o *software Image J* para sobreposição de imagens através da função MERGE.

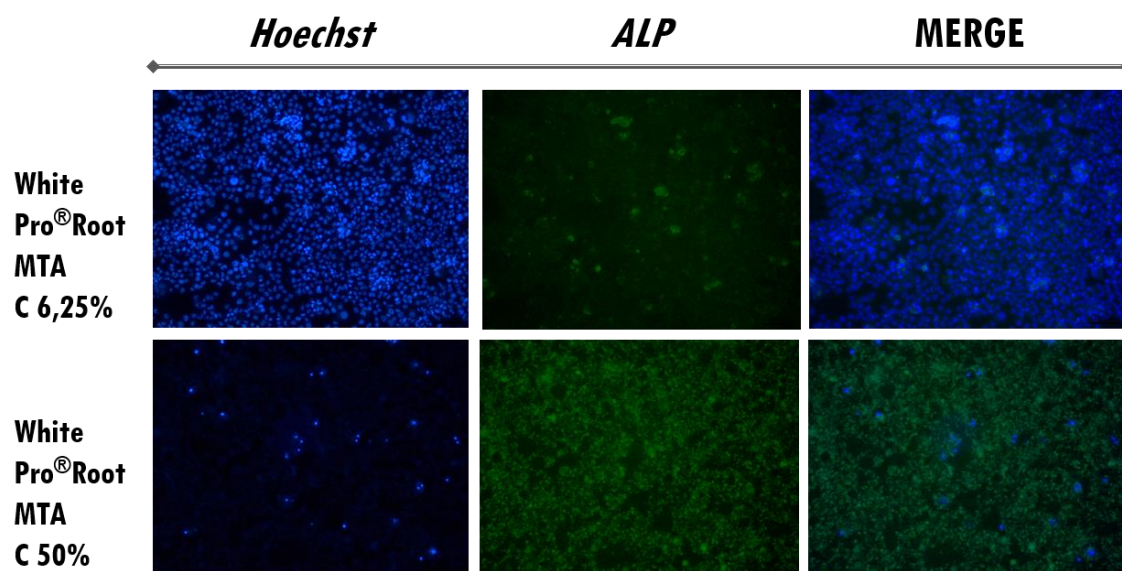


Figura 23: Imagens de células em cultura, coradas com *AP Live Stain* (verde) e *Hoechst 33252* (azul), da linha MDPC-23 quando submetidas ao tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®] MTA nas concentrações de 50% e de 6,25%. Todas foram obtidas com uma ampliação 100X. As imagens de microscopia de fluorescência obtidas foram sobrepostas através da função MERGE com o *software Image J* para sobreposição de imagens através da função MERGE.

Por outro lado, e ainda nas células expostas ao mesmo biomaterial, mas na concentração de 50%, verificou-se que a marcação verde está dispersa em cerca de 80% das células. Observou-se, ainda, nas culturas tratadas com a concentração de 50%, uma diminuição da marcação *Hoechst*.

Nas culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Biodentine™ (Figura 24) verificou-se uma marcação positiva da ALP dispersa em cerca de 15% das células na concentração de 6,25% e em cerca de 95% das células na concentração de 50%. Observou-se, ainda, que esta marcação positiva além de apresentar um padrão aumentado, é acompanhada de uma intensidade aumentada, quer relativamente ao controlo, quer em relação aos biomateriais Life® e WhiteProRoot®MTA.

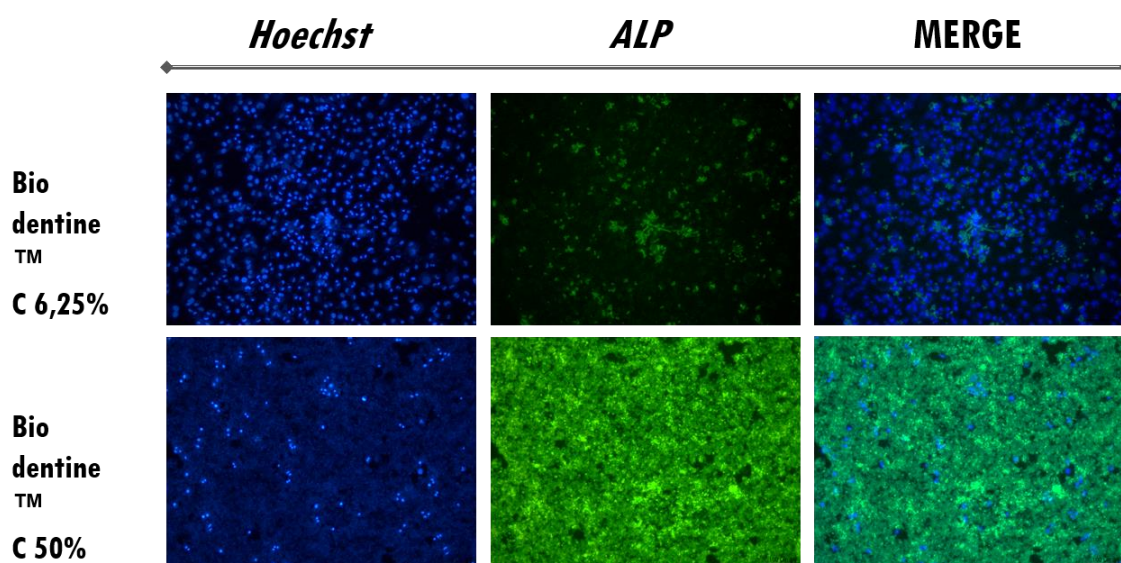


Figura 24: Imagens de células em cultura, coradas com *AP Live Stain* e *Hoechst 33252*, da linha MDPC-23 quando submetidas ao tratamento com meio condicionado com Biodentine™ nas concentrações de 50% e de 6,25%. Todas foram obtidas com uma ampliação 100X. As imagens de microscopia de fluorescência obtidas foram sobrepostas através da função MERGE com o *software Image J* para sobreposição de imagens através da função MERGE.

Este aumento da intensidade da marcação foi observado em ambas as concentrações de Biodentine™, mas de uma forma mais acentuada na concentração de 50%. Da mesma forma como nas culturas expostas ao tratamento com WhiteProRoot®MTA na concentração de 50%, as

culturas tratadas com Biodentine™ na concentração de 50%, apresentaram uma diminuição da marcação *Hoechst*.

Fosfatase alcalina - expressão génica

A expressão do gene *ALP* pelas células foi influenciada pelos tratamentos com os meios condicionados com os biomateriais Life®, Biodentine™ e WhiteProRoot®MTA de modo significativo em todos eles, mas dependente da concentração dos mesmos. Estes resultados, relativos à expressão do gene *ALP* após 96 horas de exposição, podem ser observados na Figura 25.

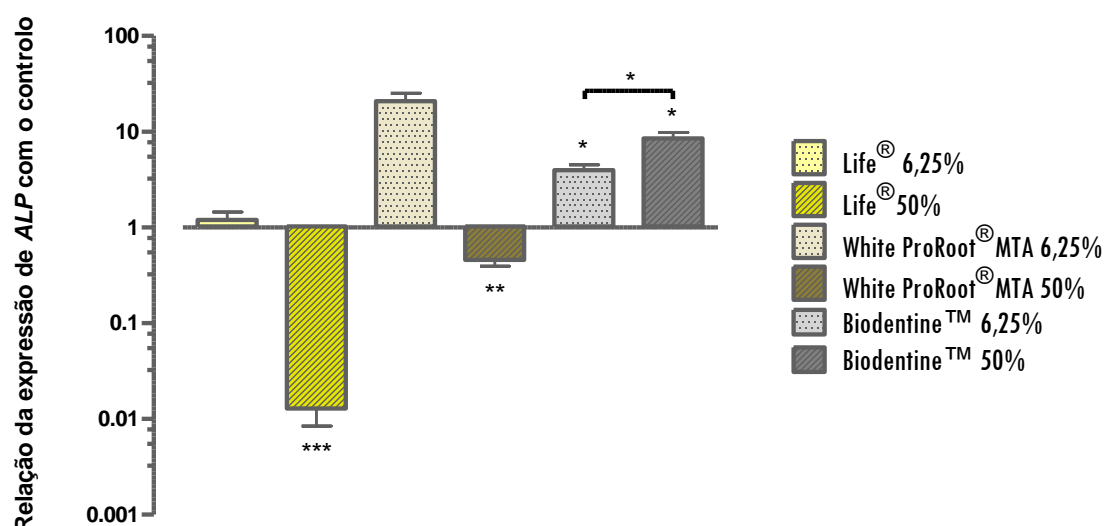


Figura 25: Expressão do gene da fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 submetidas ao tratamento com meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot®MTA e Biodentine™ após 96 horas de exposição. Os resultados representam a média e erro padrão de 4 ensaios. As diferenças significativas em relação ao controlo e entre condições estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

Relativamente às culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Life® observou-se diminuição significativa da expressão génica de *ALP* com valores de 0,013 ($p < 0,001$) na concentração de 50%, relativamente ao controlo. Nas culturas submetidas ao

tratamento com meio condicionado com Life[®] na concentração de 6,25% não se observaram alterações significativas, relativamente ao controlo.

O tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot[®]MTA apresentou alterações na expressão do gene *ALP*. No tratamento com a concentração de 50% verificou-se diminuição significativa da expressão do gene com valores de 0,46 relativamente ao controlo ($p < 0,01$).

Nas culturas submetidas ao tratamento com meio condicionado com Biodentine[™] verificou-se aumento significativo da expressão de *ALP* com valores de 3,96 ($p < 0,05$) na concentração de 6,25% e com valores de 8,51 ($p < 0,05$) na concentração de 50%, relativamente ao controlo. Além disso, com este biomaterial observaram-se diferenças significativas entre as concentrações, sendo a expressão do gene *ALP* superior na concentração de 50% relativamente à concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

Após 96 horas de incubação com os meios condicionados com os biomateriais na concentração de 6,25% verificou-se que a expressão génica de ALP nas células expostas ao WhiteProRoot[®]MTA foi estatisticamente superior às expostas ao Life[®] ($p < 0,01$). Nas culturas submetidas a concentrações de 50% verificou-se, também, um aumento significativo da expressão do gene *ALP* das células expostas ao Biodentine[™] quando comparadas com as expostas ao Life[®] ($p < 0,01$).

Mineralização

Sialoproteína da dentina

O painel de imagens apresentado na Figura 26 corresponde às células na condição controlo e após terem sido submetidas à exposição a cada um dos biomateriais em estudo com as duas concentrações selecionadas para este ensaio.

A marcação por imunocitoquímica da sialoproteína da dentina, proteína sintetizada pelas células odontoblásticas, pode ser observada no painel de figuras de cor acastanhada. Pela avaliação das imagens da condição controlo verificou-se que as células da linha MDPC-23 expressam a DSP, sintetizando-a no citoplasma, como se observa pela marcação da cor

acastanhada presente em cerca de 100% das células. Esta marcação positiva também se verificou nas culturas celulares submetidas aos meios condicionados com os biomateriais em estudo.

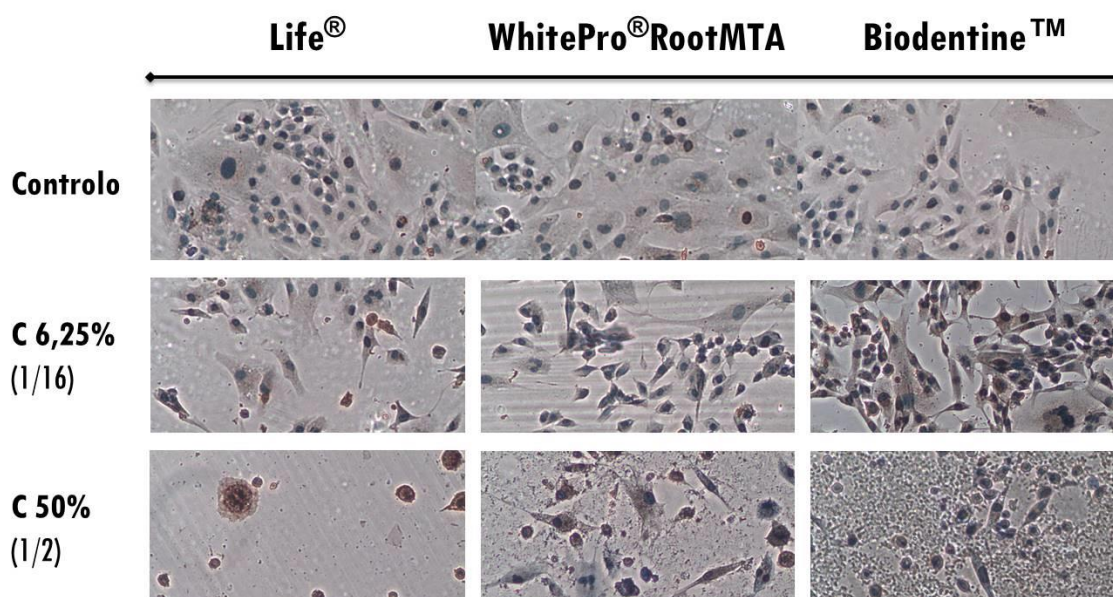


Figura 26:- Imagens de lamelas de células da linha MDPC-23 em cultura, marcadas por imunocitoquímica para a deteção da expressão de DSP, quando submetidas ao tratamento com meios condicionados com os biomateriais Life[®], WhiteProRoot[®]MTA e Biodentine[™] nas concentrações de 50% e de 6,25%, após 96 horas de incubação. O grupo controlo representa células em cultura em DMEM com 10% de FBS. Todas as fotografias foram obtidas com a ampliação de 100X. Estes ensaios foram realizados em duplicado.

No tratamento das culturas celulares com meio condicionado com Life[®] verificou-se a marcação positiva nas células expostas à concentração de 6,25%.

Nas culturas celulares submetidas ao WhiteProRoot[®]MTA verificou-se a marcação positiva das células para esta proteína, embora com uma intensidade da cor acastanhada semelhante ao controlo para a concentração 6,25%. Por outro lado, e ainda nas células expostas ao mesmo biomaterial, mas na concentração 50%, verificou-se que a marcação acastanhada não é restrita ao citoplasma, podendo ser observada nos espaços intercelulares. Nas culturas celulares submetidas ao tratamento com Biodentine[™] verificou-se uma marcação positiva da DSP com um padrão semelhante ao do WhiteProRoot[®]MTA, mas com uma maior intensidade da coloração

acastanhada relativamente ao controlo e aos biomateriais Life[®] e WhiteProRoot[®]MTA. Este aumento da intensidade da marcação foi observado em ambas as concentrações de Biodentine[™].

Depósitos de cálcio - morfologia

O painel de imagens apresentado na Figura 27 corresponde ao controlo e a cada um dos materiais de estudo com as duas concentrações selecionadas para este ensaio.

A deteção dos depósitos de cálcio, através do ensaio colorimétrico com o *Alizarin Red S*, pode ser observada no painel da figura 27. Pela avaliação das imagens das células na condição controlo verificou-se que a linha MDPC-23 forma depósitos de cálcio extracelulares, como se observa pela marcação de cor avermelhada. Esta marcação positiva também se verificou nas culturas celulares submetidas aos biomateriais WhiteProRoot[®]MTA e Biodentine[™].

Nas culturas celulares expostas ao tratamento com meio condicionado com Life[®] verificou-se uma marcação avermelhada escura dispersa.

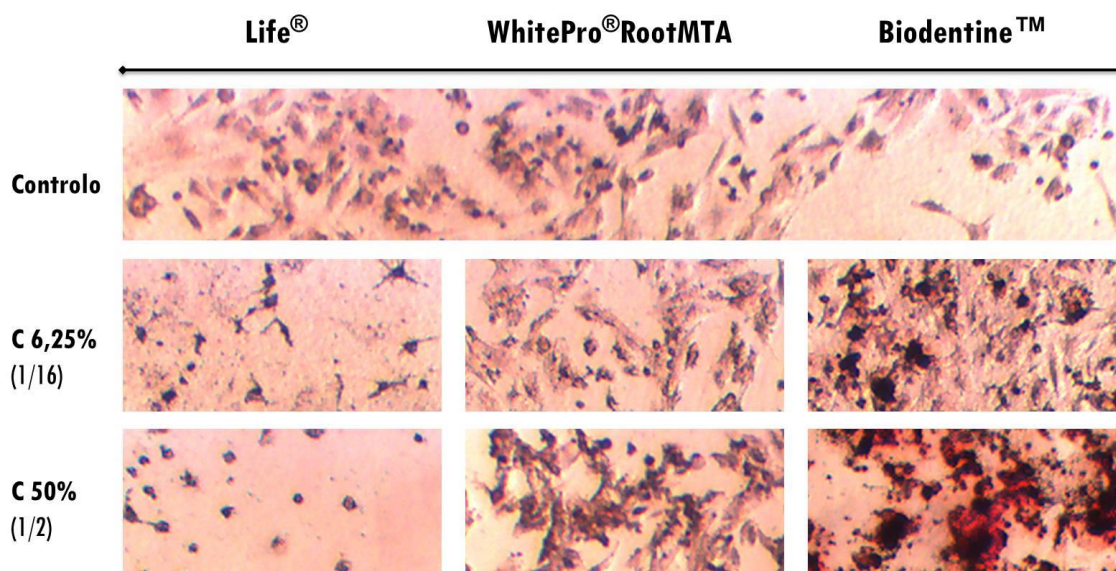


Figura 27: Imagens de lamelas de células da linha MDPC-23 em cultura, coradas com o corante *Alizarin Red S*, quando submetidas ao tratamento com meios condicionados com os biomateriais Life[®], White ProRoot[®] MTA e Biodentine[™] nas concentrações de 50% e de 6,25%. O grupo controlo representa células em cultura em DMEM com 10% de FBS. Todas as fotografias foram obtidas com a ampliação de 100X. Estes ensaios foram realizados em duplicado.

Nas culturas celulares submetidas ao meio condicionado com WhiteProRoot®MTA verificou-se marcação positiva das células para os depósitos de cálcio, embora com um padrão ligeiramente diminuído em relação ao controlo para a concentração de 6,25%. Por outro lado, e ainda nas células expostas a este biomaterial mas na concentração de 50%, verificou-se que a marcação avermelhada tem um padrão aumentado relativamente ao controlo. Nas culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Biodentine™ verificou-se marcação positiva dos depósitos de cálcio com um padrão e intensidades aumentados, quer relativamente ao controlo, quer em relação aos biomateriais Life® e White ProRoot®MTA. Este aumento da intensidade da marcação foi observado com as duas concentrações de Biodentine™, mas de uma forma mais acentuada na concentração de 50%.

Depósitos de cálcio - quantificação

A formação de depósitos de cálcio pelas células foi influenciada pelos tratamentos com os meios condicionados com os biomateriais Biodentine™ e Life® de um modo significativo e dependente da concentração do biomaterial, quando comparados com o controlo. O tratamento com WhiteProRoot®MTA apresentou alterações, mas apenas entre concentrações. Estes resultados, relativos à formação dos depósitos de cálcio, após 120 horas de exposição aos meios condicionados, podem ser observados na Figura 28.

Relativamente às culturas celulares submetidas ao tratamento com meio condicionado com Life® observou-se diminuição significativa da formação de depósitos de cálcio, com valores de $0,62 \pm 0,08$ ($p < 0,05$) com a concentração de 6,25% e com valores de $0,61 \pm 0,06$ ($p < 0,01$) com a concentração de 50%.

O tratamento com meio condicionado com WhiteProRoot®MTA não apresentou alterações, com significado estatístico, na formação de depósitos de cálcio relativamente ao controlo, no entanto observaram-se diferenças significativas entre a concentração de 6,25% e a concentração de 50% ($p < 0,05$).

Nas culturas submetidas ao tratamento com meio condicionado com Biodentine™ verificou-

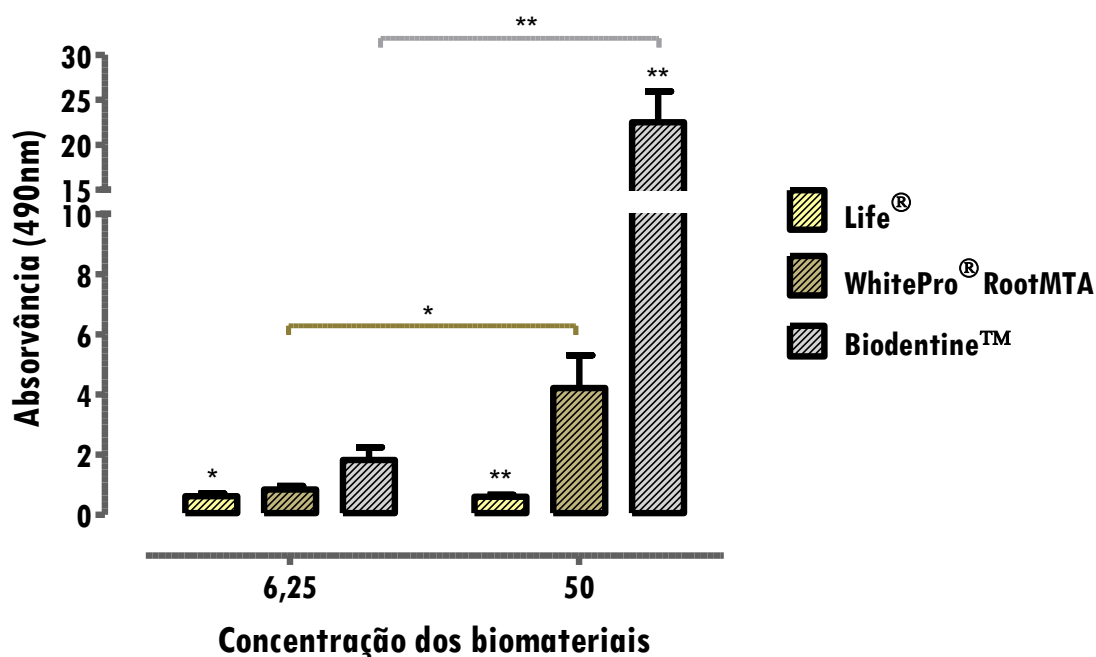


Figura 28: Formação de depósitos de cálcio das células MDPC-23 submetidas ao tratamento com meios condicionados com os biomateriais Life®, WhiteProRoot® MTA e Biodentine™ após 120 horas de exposição. Os resultados representam a média e erro padrão de 6 ensaios, e são a relação entre as absorvâncias obtidas entre a condição de estudo e o controle. As diferenças significativas em relação ao controle e entre condições estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

se um aumento significativo da formação de depósitos de cálcio, com valores de $22,49 \pm 3,43$ ($p < 0,01$) com a concentração de 50%, não se observando alterações na concentração de 6,25%, relativamente ao controle.

No entanto, observaram-se diferenças significativas entre as concentrações, sendo a formação de depósitos de cálcio superior com a concentração de 50%, relativamente à concentração de 6,25% ($p < 0,01$).

A formação dos depósitos de cálcio foi, também, avaliada por comparações múltiplas entre os diferentes meios condicionados e com a mesma concentração. Assim, após 120 horas de incubação com os meios condicionados com biomateriais na concentração de 50% verificou-se aumento significativo da formação de depósitos de cálcio pelas culturas celulares expostas ao Biodentine™, quando comparadas com as expostas ao Life® ($p < 0,001$). De forma semelhante, com a concentração de 6,25% verificou-se, também, aumento significativo da formação dos

depósitos pelas culturas celulares expostas ao Biodentine™, quando comparadas com as expostas ao Life® ($p < 0.01$).

Discussão

A dentinogénese primária e secundária pode ser estudada através de metodologias diversas, nomeadamente, através de linhas celulares individualizadas, de culturas de órgãos ou de ensaios com animais (Silva *et al.*, 2016). Para o objetivo do nosso estudo, uma vez que a dentinogénese é um processo biológico complexo e, embora uma cultura em monocamada não possa mimetizar na sua plenitude a morfodiferenciação do tecido, foi escolhida uma linha celular individualizada. A cultura de linhas celulares tem potencial para o estudo da dentinogénese, para o desenvolvimento de materiais restauradores biocompatíveis e outros propósitos (Hanks *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2016). De facto, a utilização das linhas celulares possibilita o estudo de inúmeras moléculas, incluindo proteínas, *mRNA* e *DNA* relevantes no processo da odontogénese; pesquisa de hormonas, fatores de crescimento e citocinas para reconhecer a sua função celular; e estudos de citotoxicidade, para determinar os efeitos de diversos materiais na função odontoblástica e o seu potencial para modificar os processos da dentinogénese (Laurent, Camps e About, 2012; Park *et al.*, 2014; Semeghini *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016).

Para elaborar o estudo *in vitro* foram ponderados vários modelos. As linhas celulares imortalizadas de células pulpares foram o modelo selecionado uma vez que fornece resultados mais reprodutíveis quando comparado com os outros, nomeadamente as culturas primárias (Murray e Garcia-Godoy, 2007; Murray, García Godoy e García Godoy, 2007; Wataha, 2001). Na realidade, este modelo de culturas celulares primárias, obtidas a partir do tecido pulpar, também foi iniciado neste estudo. No entanto, prescindiu-se da sua execução devido a dificuldades inerentes da técnica, ao tempo longo de otimização destas culturas, à sua indispensável caracterização antes do início dos testes citotóxicos *in vitro* dos biomateriais, e, como já referido à sua menor reprodutibilidade (Couble *et al.*, 2000; Demarco *et al.*, 2010, 2011;

Lin *et al.*, 2011; Takeda *et al.*, 2008). Outro modelo possível, que pretende mimetizar o que ocorre no tecido dentário pulpar, é a cultura de explantes de órgãos. Através do isolamento da papila dentária incisiva ou molar em condições definidas, esta técnica tenta preservar a morfologia, função e relações celulares. A desvantagem deste modelo é a fraca reprodutibilidade, e a variabilidade celular da papila dentária que dificulta a análise objetiva dos resultados (Camps *et al.*, 2002; Hanks *et al.*, 1998).

Nas últimas décadas surgiram algumas linhas celulares que correspondem ao fenótipo de odontoblastos (*RPC-C2A*, *RDP 4-1*, *MO6-G3*, *MDCP-23*, *M2H4*) (Koulaouzidou *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2004). No entanto, algumas destas linhas celulares obtidas a partir de tecido pulpar apresentaram alguns problemas associados ao seu estabelecimento, caracterização e manutenção. Vários autores fazem referência de dificuldades no isolamento de uma população homogênea de odontoblastos ou células precursoras da polpa ou da papila dentária, na manutenção em cultura do fenótipo característico e na demonstração da expressão de marcadores dentinários específicos (Hanks *et al.*, 1998; Semeghini *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 1998).

A linha celular MDPC-23 utilizada neste estudo foi estabelecida, como já referido, por Hanks e colaboradores, sendo uma linha imortalizada de células tipo-odontoblastos. Esta foi a linha escolhida para este estudo *in vitro* por estar bem caracterizada, por expressar os marcadores da dentina específicos, tais como a fosfoproteína da dentina moderadamente fosforilada (DPP-MP do inglês *moderately phosphorylated dentin phosphoprotein*) e a DSP (Hanks *et al.*, 1998, 1998; Huang, Shagramanova e Chan, 2006; Sun *et al.*, 1998) e, por possuir receptores da interleucina-10, associados aos estádios iniciais da dentinogênese (Ferreira *et al.*, 2015). Outros estudos mais recentes demonstram que a linha MDCP-23 expressa também DMP-1 (Salehi *et al.*, 2016; Semeghini *et al.*, 2012).

O nosso estudo foi elaborado tendo em consideração as orientações da norma ISO 10993-5, que se refere à avaliação da citotoxicidade *in vitro*, com o objetivo de contribuir para a reprodutibilidade científica dos trabalhos de investigação (Chander, 2016). Esta é uma preocupação cada vez mais patente na literatura, e são já vários os autores que seguem estas recomendações no desenho experimental dos seus estudos *in vitro* (Cavalcanti *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014; Daltoé *et al.*, 2016; Elias *et al.*, 2007; Huang, Shagramanova e Chan, 2006;

Jafarnia *et al.*, 2009; Paranjpe *et al.*, 2011; Paranjpe, Zhang e Johnson, 2010; Yasuda *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2013).

A norma ISO 10993-5 recomenda a avaliação da citotoxicidade dos compostos através de três modos de aplicação, nomeadamente, a utilização de extratos previamente preparados com os (bio)materiais, o contacto direto dos (bio)materiais com as culturas celulares e, finalmente, o contacto indireto. A seleção do modo de aplicação é feita de acordo com as características e a função do material a testar (ISO, 2009). Para o presente estudo foi escolhido o teste dos extratos por duas razões principais. Por um lado, a linha celular escolhida era aderente, e a utilização dos extratos possibilitava a adesão regular das células à superfície das placas de cultura, sem alteração das condições de cultura ótimas. Esta questão era extremamente importante, uma vez que como a taxa de duplicação da linha celular MDPC-23 é elevada, as células podiam entrar em excesso de confluência em ensaios mais longos, devido à ocupação do espaço pelos próprios biomateriais. Por outro lado, a utilização de extratos possibilitou a avaliação de diferentes concentrações, o que permitiu mimetizar o que ocorre na aplicação clínica, uma vez que poderá haver alguma difusão de substâncias destes materiais por estarem, particularmente, em contacto direto com tecidos muito vascularizados. Os testes do contacto direto não permitem a avaliação de diferentes concentrações de uma forma rigorosa e podem interferir na adesão das células, no caso de serem colocados na superfície da placa de cultura (Cavalcanti *et al.*, 2011; Paranjpe *et al.*, 2011), como já referido. Os testes de contacto indireto não foram considerados no âmbito deste trabalho, para prevenir potenciais dificuldade de não difusão, difusão incompleta através de membranas ou reação com o agar.

A norma ISO 10993-5 abrange tanto testes com materiais após tomada de presa como materiais sem presa completa. Neste sentido, sabe-se que em estudos anteriores com cimentos à base de MTA sem presa completa, a citotoxicidade foi superior do que a dos mesmos materiais com presa completa (Jafarnia *et al.*, 2009). De facto, está documentado que os biomateriais, quando são utilizados frescos libertam uma série de subprodutos químicos que podem ser citotóxicos para as células em cultura. No entanto, sob condições *in vivo*, estes subprodutos são diluídos nos fluídos intersticiais e são eliminados pelas vias de excreção normais. No sentido de colmatar esta situação, alguns autores optam por utilizar materiais frescos, mas lavados

(Perinpanayagam, 2009). Tendo em conta estas referências da literatura e devido aos condicionalismos físicos necessários na obtenção da forma dos *pellets*, nomeadamente a necessidade da obtenção do biomaterial numa forma sólida e estável para se estabelecer com rigor a superfície de contato com o meio de cultura, foi escolhido para o presente estudo o modelo de presa completa. De acordo com a norma, os testes *in vitro* devem exagerar as condições de utilização clínica, por forma a determinar o potencial citotóxico, o que se relaciona com a superfície de contacto do material com o meio de cultura. Uma vez que na norma não é referida nenhuma relação área de contacto/ volume de meio de cultura específica, no presente estudo foi escolhida a relação de 250 mm² por mL de meio, já utilizada noutros estudos (Zhou *et al.*, 2013). É, também, referido que este procedimento deve ser concretizado sem alterações significativas das amostras dos biomateriais a testar, o que se verificou (Daltoé *et al.*, 2016; ISO, 2009).

Ainda segundo a ISO 10993-5 as amostras devem ser esterilizadas, mesmo que não sejam utilizadas dessa forma em clínica, através de métodos que não alterem as suas propriedades. Todos os dispositivos necessários para a execução dos extratos devem, também, ser esterilizados (Daltoé *et al.*, 2016; ISO, 2009). Estes princípios são fundamentais para que não ocorra contaminação microbiana das culturas celulares. No presente estudo, a esterilização das amostras dos biomateriais foi efetuada por luz ultra-violeta (Daltoé *et al.*, 2016; Eid *et al.*, 2014).

De igual forma, a escolha para o veículo dos extratos deve ter em conta as características químicas dos biomateriais, podendo ser o próprio meio de cultura suplementado com soro ou, alternativamente, uma solução salina fisiológica. As condições para a extração devem ser ajustadas ao modelo experimental (ISO, 2009). No presente utilizou-se o meio de cultura DMEM, suplementado com soro bovino fetal, por ser o meio de cultura indicado para a linha celular MDPC-23. A extração foi realizada, de acordo com a opção mais adequada, durante 24±2 horas a 37±1°C. O pH dos extratos não foi ajustado, conforme recomendado, por forma a não ocorrerem alterações nos resultados das experiências (ISO, 2009).

De facto, há outras particularidades inerentes à experimentação em cultura de células que são salientadas na norma ISO e que, naturalmente, foram tidas em conta neste trabalho. Foram preparados controlos da mesma forma como as amostras teste. As culturas celulares foram

manipuladas de acordo com o referenciado, nomeadamente na elaboração de *stocks* com as técnicas de congelação e descongelação padronizadas e na manutenção das células em cultura, segundo as boas práticas de cultura celular (ISO, 2009). Da mesma forma, os meios de cultura foram utilizados de acordo com os requisitos da linha celular selecionada, nomeadamente as condições de esterilidade, a suplementação com antibióticos, o armazenamento em condições adequadas e a manutenção de um pH entre 7,2 e 7,4. A norma ISO refere que os testes dos extratos devem ser efetuados em culturas celulares aderentes em monocamada subconfluentes, ou em culturas celulares em suspensão. Refere ainda que deve ser utilizado o extrato original ou o mesmo com uma série de diluições do extrato original, efetuadas com o veículo dos mesmos.

Inicialmente, a linha celular aderente MDPC-23 foi avaliada no que respeita ao tempo de duplicação. Com base neste dado, que correspondeu a $17,48 \pm 4,25$ horas foi determinado o número de células a colocar nas placas de cultura para cada um dos ensaios efetuados, tendo em conta o tempo de incubação e a área dos recipientes.

A norma ISO preconiza, ainda, avaliações qualitativas e quantitativas, com preferência pelo segundo tipo, dando alguns exemplos de testes que devem ser realizados, como é o caso do teste MTT. A redução da viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico (ISO, 2009).

No presente estudo foram realizadas as avaliações quantitativas de citotoxicidade de acordo com a norma, nomeadamente o teste do MTT, e ainda vários ensaios com vista a compreender o processo da dentinogénese reparadora. Pretendeu-se avaliar o comportamento das culturas celulares submetidas ao tratamento com os biomateriais ao longo das diversas fases deste processo. Numa fase inicial, em que os biomateriais devem estimular as células, pretendeu-se avaliar a atividade metabólica e a viabilidade celular com os ensaios do MTT e da SRB. Ainda pretendendo avaliar os efeitos citotóxicos dos biomateriais, foram efetuados estudos dos tipos de morte celular, das alterações do potencial de membrana mitocondrial, do ciclo celular e da formação de espécies reativas de oxigénio. A fase seguinte no processo de dentinogénese reparadora é a diferenciação celular, em que as células se diferenciam em células tipo odontoblasto e sintetizam proteínas específicas. Foi possível avaliar esta fase com

estudos da morfologia celular e da síntese de duas proteínas específicas: a fosfatase alcalina e a sialoproteína da dentina, referenciadas como os maiores marcadores das células tipo-odontoblasto (Fujisawa, Mizuno e Tamura, 2009). A fase final do processo, isto é, a formação de tecido mineralizado, foi avaliada com o ensaio do *Alizarin Red S*.

O pH de um material é uma propriedade física essencial e, geralmente, relacionada com a resposta pulpar. Os resultados mostraram que o perfil de pH de todos os biomateriais é semelhante, dentro do espectro da alcalinidade, não existindo diferenças significativas entre eles. O pH diminui, aproximando-se da neutralidade à medida que a concentração dos biomateriais diminui. Os resultados que foram obtidos, de $10,90 \pm 1,30$ para os cimentos à base de MTA e de $10,51 \pm 0,64$ para os cimentos à base de hidróxido de cálcio, estão de acordo com outros estudos que referem valores que variam entre 11,50 e 11,87 para os cimentos à base de MTA e entre 10,88 e 11,09 para os cimentos à base de hidróxido de cálcio (Luczaj-Cepowicz *et al.*, 2017). Estes autores compararam ainda com os mesmos materiais sem presa completa, que apresentaram valores de pH mais elevados, de cerca de 12,31 para os cimentos à base de hidróxido de cálcio, e de 11,87 para os cimentos à base de MTA (Luczaj-Cepowicz *et al.*, 2017). O pH mais elevado nestas circunstâncias é explicado pela libertação imediata de iões OH^- nos materiais frescos. Estes resultados são corroborados por outros estudos (Antunes Bortoluzzi *et al.*, 2006; Zmener, Pameijer e Banegas, 2007). Outros autores referem que o pH do Biodentine™ é cerca de 12 em extratos obtidos por incubação durante 28 dias (Grech, Mallia e Camilleri, 2013), embora outros autores que realizaram abordagem semelhante refiram valores de 9 (Gandolfi *et al.*, 2015). Estes valores díspares devem-se aos diferentes meios utilizados para efetuar os extratos e às diferenças de porosidade dos materiais imediatamente após a preparação e ao longo do tempo (Gandolfi *et al.*, 2015). O pH dos biomateriais está relacionado com o seu efeito antimicrobiano e com a produção de ROS. Alguns autores referem que o aumento do pH, causado pela libertação de hidróxido de cálcio, pode condicionar a diminuição da formação de ROS (Eid *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2010).

A resposta da linha celular MDPC-23 perante os biomateriais foi substancialmente diferente, quer nos ensaios que avaliaram a proliferação celular, quer nos que avaliaram as

fases de diferenciação e de mineralização, particularmente no que respeita ao tratamento com o Life[®] em relação aos outros dois biomateriais.

A atividade metabólica das células MDPC-23 apresentou uma diminuição acentuada após o tratamento com o Life[®] independentemente da sua concentração. De notar que esta alteração é totalmente deletéria com as duas concentrações mais elevadas (50% e 100%), ou seja, com uma diminuição significativamente maior do que nas outras concentrações. O tratamento com o WhiteProRoot[®]MTA não determinou alterações da atividade metabólica celular. No caso das culturas celulares expostas ao Biodentine[™], observou-se a manutenção da atividade metabólica, exceto no caso do tratamento com a concentração mais elevada, em que se verificou uma diminuição significativa superior a 50% que se acentuou ao longo dos tempos de estudo (24, 72 e 120 horas).

Existem outros estudos que corroboram os resultados por nós obtidos, alguns dos quais, utilizaram a linha celular MDPC-23 como modelo experimental. Lessa e colaboradores mostraram redução da atividade metabólica das culturas celulares quando submetidas durante 24 horas aos extratos com Biodentine[™], o que não ocorreu com as expostas ao WhiteProRoot[®]MTA (Lessa *et al.*, 2010). Outros, referiram uma diminuição da atividade metabólica com as concentrações mais elevadas de extratos obtidos com o Biodentine[™] ao longo de vários tempos de estudo (Luo *et al.*, 2014). Alguns autores, também através do ensaio do MTT, concluíram que os tratamentos com o WhiteProRoot[®]MTA asseguraram a manutenção da proliferação celular semelhante ao controlo (Paranjpe, Zhang e Johnson, 2010; Yasuda *et al.*, 2008), enquanto que nos tratamentos com o Life[®] se verificou uma diminuição (Luczaj-Cepowicz *et al.*, 2017; Poggio *et al.*, 2014), particularmente nas concentrações mais elevadas (Camargo *et al.*, 2009). No entanto, também existem alguns estudos que apresentam resultados diferentes, especialmente no que respeita aos cimentos à base de agregados trióxido minerais. Alguns autores concluíram que a exposição ao ProRoot[®]MTA e ao Biodentine[™] determinaram valores de proliferação celular semelhantes após vários períodos de incubação em diferentes linhas celulares (Chang *et al.*, 2014; Daltoé *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2015) embora, por vezes, até 20% inferior à das culturas controlo (Zhou *et al.*, 2013). Por outro lado, Nuñez e colaboradores demonstraram um aumento da proliferação celular de culturas submetidas ao Biodentine[™], ao

contrário do que ocorreu com outras submetidas a um cimento de ionómero de vidro. Um aumento similar não se verificou com aquelas tratadas com o ProRoot[®]MTA. Os autores explicam estas diferenças com as desiguais composições dos dois biomateriais, com destaque para a potencial citotoxicidade do óxido de bismuto presente no ProRoot[®]MTA (Camilleri *et al.*, 2004; Nuñez *et al.*, 2014). Outros autores demonstraram que as formulações cinzentas dos cimentos à base de MTA apresentam maior citotoxicidade do que as formulações brancas, presumivelmente devido à presença de arsénio, um conhecido inibidor da atividade enzimática (Luczaj-Cepowicz *et al.*, 2017; Monteiro Bramante *et al.*, 2008). Porém, outros observam o efeito contrário entre as formulações cinzentas e brancas, com a técnica de contacto direto *versus* a técnica dos extratos (Eid *et al.*, 2014). Com a metodologia de contacto indireto através de gel de agarose, referida na norma ISO, tanto o cimento à base de MTA como o cimento à base de silicato tricálcico não levaram a alterações da atividade metabólica de duas linhas celulares diferentes (Laurent *et al.*, 2008). No entanto, este facto poder-se-á dever à incapacidade de difusão dos biomateriais no agar, considerando-se uma metodologia não adequada a estes biomateriais.

A avaliação da citotoxicidade através do ensaio do MTT é frequentemente utilizada para a obtenção de um *screening* dos vários compostos (Wang Y, 2010). Tendo em conta o princípio da técnica, a redução do MTT indica o estado metabólico das células e é influenciada por vários fatores intrínsecos ao metabolismo celular particularmente os inerentes à mitocôndria (Vistica *et al.*, 1991). No entanto, este ensaio pode subestimar o dano celular, uma vez que os resultados são influenciados também pelas células em morte apoptótica, mesmo quando o seu metabolismo está substancialmente reduzido (Zhou *et al.*, 2013). Assim, de modo complementar, realizou-se o ensaio da SRB que correlaciona o conteúdo proteico com a viabilidade através a quantificação da biomassa celular (Freshney, 2010).

Os resultados obtidos no nosso trabalho, através do ensaio da SRB, corroboram os do ensaio do MTT, uma vez que a viabilidade celular acompanhou as alterações da atividade metabólica. Assim, verificou-se uma redução da viabilidade celular no tratamento com o Life[®] em todas as concentrações, demonstrando um comportamento semelhante ao do ensaio com o MTT. No caso do tratamento com o WhiteProRoot[®]MTA não se verificaram alterações quer de atividade metabólica, quer de viabilidade celular. No tratamento com o Biodentine[™] verificou-se uma

redução da viabilidade celular com as concentrações mais elevadas (100% e 50%). Com a concentração de 100% verificou-se, ao contrário do ensaio com o MTT em que esta diminuição se acentuou ao longo dos tempos de estudo, uma diminuição apenas às 24 horas com uma recuperação nos outros tempos de estudo. Com a concentração 50% verificou-se uma diminuição menos acentuada, mas ainda assim, com valores elevados de viabilidade (superiores a 80%). Este comportamento significa que as células são afetadas, mas a viabilidade não é comprometida.

Poucos estudos utilizaram o ensaio da SRB para avaliar a viabilidade celular. Os autores que a avaliam referem uma diminuição entre 40% a 45% para a viabilidade celular em culturas tratadas com ProRoot®MTA durante 24 horas. Neste estudo a adição de um antioxidante, a N-acetilcisteína, protegeu a viabilidade celular, uma vez que limitou os efeitos tóxicos do ião alumínio libertado dos cimentos à base de MTA (Minamikawa *et al.*, 2011).

Os resultados relativos à atividade metabólica e à viabilidade celular são corroborados pela análise da proliferação celular realizada às 120 horas. Com estes estudos foi possível avaliar os efeitos dos biomateriais sobre as culturas celulares ao longo do tempo.

Os estudos subsequentes, com os quais se pretendeu aprofundar os efeitos citotóxicos dos biomateriais, nomeadamente a avaliação das vias de morte, do potencial de membrana mitocondrial, do ciclo celular e da produção de espécies reativas de oxigénio, foram efetuados após 120 horas de incubação. A escolha deste tempo de incubação prendeu-se com o facto de se pretenderem avaliar os efeitos citotóxicos numa fase com menor potencial de reversibilidade.

A avaliação dos mecanismos de morte revestiu-se de particular importância, com dados preponderantes no tratamento com o Life® em todas as concentrações, e no tratamento com o Biodentine™ em concentrações elevadas. No caso destes tratamentos verificaram-se alterações da viabilidade celular. No tratamento com o Life®, nas concentrações mais elevadas, verificou-se um aumento das populações em apoptose e em apoptose tardia/necrose. Por outro lado, nas concentrações mais baixas verificou-se um aumento das populações em necrose. Nas culturas celulares submetidas ao tratamento com o Biodentine™ verificou-se um aumento das células em apoptose tardia/necrose e necrose. Por outro lado, o tratamento com o WhiteProRoot®MTA não influenciou a viabilidade e a morte celular.

Noutros estudos, foi referida a inexistência de alterações na viabilidade e na morte celular das culturas expostas ao tratamento com o WhiteProRoot[®]MTA, quer seja avaliado com ou sem presa (Moghaddame-Jafari *et al.*, 2005). Outros autores demonstraram a preferência pela morte por apoptose, em detrimento da necrose, quando em culturas as celulares são expostas ao tratamento com formulações cinzentas de ProRoot[®]MTA. Nestes estudos verificou-se uma diminuição significativa do número de células vivas após os tratamentos com ProRoot[®]MTA, nas formas cinzenta ou branca (Eid *et al.*, 2014).

A morte por necrose pode ocorrer em sequência da apoptose quando os danos são muito elevados, ou poderá ser uma via ativada independentemente. Isto foi observado num estudo com dois tipos de cimentos à base de MTA, em que a diminuição da viabilidade ocorreu por apoptose, em vez de necrose. Os autores sugerem que, numa fase inicial, o dano provocado pelos agentes citotóxicos ocorre a nível citoplasmático, uma vez que as membranas nucleares dessas células continuaram intactas (Eid *et al.*, 2014). Alguns autores sugerem que a expressão de proteínas, nomeadamente a fosfoproteína da dentina, pode prevenir a apoptose induzida por fosfatos inorgânicos. Esta proteína é uma componente da matriz extracelular, pode suportar a sobrevivência da célula e promove a adesão das células o que pode prevenir a apoptose (Eid *et al.*, 2013). Outro mecanismo de prevenção da apoptose é a inibição da formação do complexo cálcio-fosfato. A fosfoproteína da dentina previne a formação deste complexo, ligando-se-lhes o que evita que se liguem à membrana citoplasmática. Os autores referem que não ocorre apoptose durante a fase de diferenciação celular uma vez que, nesta fase, a expressão destas proteínas está aumentada (Fujisawa, Mizuno e Tamura, 2009).

O comprometimento da viabilidade celular nos tratamentos com o Life[®] nas concentrações 100% e 50%, não permitiu a obtenção de número de células suficiente para a realização de alguns ensaios, nomeadamente para avaliar o potencial de membrana mitocondrial com o indicador JC-1, o ciclo celular, e a produção de peróxidos com a sonda DCF.

A mitocôndria está no centro da deteção e da integração de diversos sinais de stresse e os distúrbios mitocondriais geralmente ocorrem muito antes de quaisquer sinais morfológicos de apoptose. A função mitocondrial na apoptose depende de múltiplos mecanismos, incluindo a libertação de proteínas apoptogénicas para o citoplasma, após a permeabilização da membrana

externa mitocondrial; a perda de processos fisiológicos mitocondriais indispensáveis à sobrevivência; e a geração de espécies reativas de oxigênio (Wlodkowic *et al.*, 2011). O potencial de membrana mitocondrial reflete a atividade da cadeia transportadora de eletrões assim como a função mitocondrial. A disrupção do potencial de membrana mitocondrial constitui uma característica da apoptose (Laranjo *et al.*, 2013). O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado através da razão monómeros/agregados da sonda JC-1, que coexiste na forma monomérica ou agregada, sendo esta razão inversamente proporcional à disrupção deste potencial. Os resultados demonstram uma disrupção do potencial de membrana após os tratamentos com WhiteProRoot[®]MTA com as concentrações mais elevadas. Assim, verifica-se que a função mitocondrial é afetada com a presença de WhiteProRoot[®]MTA, não sendo relevante o suficiente para influenciar a viabilidade celular. Nos tratamentos com o Biodentine[™] o potencial de membrana mitocondrial foi pouco alterado, excepto após o tratamento com a concentração de 50%, em que se observou um maior potencial. Estes resultados levam a crer que a morte celular por apoptose tardia e por necrose observada deverá ser explicada por vias independentes da mitocôndria. De facto, a avaliação do potencial de membrana não tem sido um ensaio comumente efetuado em estudo deste âmbito, sendo escassos os dados sobre o comprometimento da mitocôndria.

Os tratamentos com os três biomateriais influenciaram a progressão do ciclo celular, observando-se alterações na distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo. À semelhança das culturas celulares controlo, após os tratamentos com os biomateriais a fase G0/G1 foi predominante. No caso da exposição ao Life[®] verificou-se a diminuição das células nesta fase e aumento na fase G2/M. Uma circunstância semelhante já tinha sido referida, por outros autores, que utilizaram um monómero TEGMA como controlo positivo. O aumento do número de células em G2/M foi associado a um estado de menor proliferação celular, com a maioria das células numa fase quiescente (Camargo *et al.*, 2009). Com os tratamentos com o WhiteProRoot[®]MTA verificou-se aumento da população em fase S. Quanto aos tratamentos com o Biodentine[™] houve alterações com significado estatístico na concentração mais elevada, com aumento na fase pré-G0, na fase S e na fase G2/M com consequente diminuição da fase G0/G1. Alguns autores demonstraram que as culturas celulares tratadas com WhiteProRoot[®]MTA com

presa e sem presa apresentaram menor número de células na fase G0/G1, com aumento das populações nas fases S e G2/M, corroborando os resultados do nosso estudo. O aumento das células nas fases S e G2/M pode estar associado à indução de vias de sinalização, de modo a ocorrer a diferenciação (Moghaddame-Jafari *et al.*, 2005). O aumento da fase S e G2/M, já reportado noutros estudos com MTA e observado no presente estudo com o WhiteProRoot® MTA e o Biodentine™, sugere um aumento das células na fase de proliferação, indicando que estes biomateriais podem ter um efeito positivo na regeneração do tecido pulpar *in vivo* (Camargo *et al.*, 2009).

A avaliação da produção intracelular de peróxidos é indicativa do estado redox da célula e permite compreender as respostas celulares aos biomateriais. As espécies reativas de oxigênio são um subproduto natural do metabolismo do oxigênio e têm um papel fundamental na regulação de outras vias de sinalização, de proliferação e de sobrevivência celulares (Valko *et al.*, 2007). Por outro lado, um aumento excessivo da produção de peróxidos durante o stresse celular, resulta em danos significativos para a estrutura da célula, como é típico das doenças neurodegenerativas, do cancro ou do envelhecimento (Eid *et al.*, 2014; Valko *et al.*, 2007).

No presente estudo verificou-se um aumento da produção de peróxidos na dependência direta da concentração, nos tratamentos com WhiteProRoot® MTA e com Biodentine™. Os tratamentos com o Life® na concentração de 6,25% revelaram também um aumento na formação intracelular de ROS. Como já referido, a produção excessiva de ROS pode resultar em perda da função celular, em apoptose ou em necrose. No entanto, os aumentos verificados neste estudo podem não ultrapassar os valores considerados deletérios para esta linha celular (Pervaiz e Clement, 2007; Thannickal e Fanburg, 2000).

Já foi referido que a reparação do tecido pulpar, através das terapêuticas de proteção pulpar direta com um biomaterial, envolve uma cascata de acontecimentos designada de dentinogénese reparadora. Este processo inclui uma inflamação inicial moderada, a estimulação de células indiferenciadas presentes no tecido pulpar, a sua proliferação e a sua posterior diferenciação. A estimulação transitória da expressão de citocinas proinflamatórias pode ser um efeito desejável. Avaliando a produção de ROS alguns estudos indicam que a adição de antioxidantes aos biomateriais diminui a sua produção, potenciando os efeitos de cicatrização

do tecido pulpar (Minamikawa *et al.*, 2011). Esta diminuição do stresse oxidativo pode aumentar a capacidade das células do tipo odontoblasto de se diferenciarem e de depositarem matriz mineralizada (Eid *et al.*, 2014). Foi demonstrado que os tratamentos com ProRoot[®]MTA, MTA Angelus[®] e com Biodentine[™] determinam uma produção baixa de ROS e de mediadores proinflamatórios, como a IL-1 β , o TNF- α , a IL-6 e a IL-8. Estes mediadores estão envolvidos nas fases iniciais do processo inflamatório e podem contribuir para a sequência de eventos de cicatrização, induzindo a expressão de heme-oxigenase-1, por ativação da via da proteína cinase (*protein kinase signaling pathway* - MAPKs) (Cavalcanti *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014, 2014; Ishii, Itoh e Yamamoto, 2002; Jung *et al.*, 2015; Karim, El *et al.*, 2016; Laurent, Camps e About, 2012; Melin *et al.*, 2000; Minamikawa *et al.*, 2011). A heme-oxigenase-1, enzima antioxidante, tem efeito citoprotetor contra os danos oxidativos e a resposta anti-inflamatória, respondendo a agentes químicos e físicos que, direta ou indiretamente, produzem ROS (Ryter e Choi, 2005). A regulação da heme-oxigenase-1 pelos odontoblastos, que se traduz num aumento da expressão de ROS, é um indicador da capacidade de defesa do tecido pulpar contra os agentes tóxicos exógenos como, por exemplo, o óxido de bismuto ou o peróxido de hidrogénio (Pervaiz e Clement, 2007; Thannickal e Fanburg, 2000). A expressão de IL-1 α e de IL-6 nas primeiras 3 horas após tratamento com ProRoot[®]MTA, diminuiu para valores semelhantes ao controlo enquanto com o tratamento com Biodentine[™] essa diminuição só se verificou após 24 horas (Chang *et al.*, 2014). Assim, a presença de ROS pode induzir *in vitro* a diferenciação celular, tendo assim um papel mais complexo na fisiologia da célula do que causando apenas o simples dano oxidativo (Lee *et al.*, 2006). No entanto, esta dicotomia entre a estimulação de vias de sinalização e de diferenciação e a indução de dano oxidativo, depende da concentração de ROS produzidas (Pervaiz e Clement, 2007). Alguns estudos demonstram que a produção de ROS não ocorre nos tratamentos com Biodentine[™], o que é considerado uma limitação deste biomaterial (Karim, El *et al.*, 2016), no entanto, neste trabalho, essa produção foi observada. No entanto, estudos *in vivo* com animais, sugerem uma ligeira inflamação com infiltrado inflamatório e dilatação mínima do sistema vascular do tecido pulpar, indicando que *in vivo*, ambos os materiais atuam no sentido da regeneração pulpar (Nuñez *et al.*, 2014). Outros estudos referem que a diminuição da pressão parcial de oxigénio, a diminuição da produção de ROS e a apoptose,

inibem a formação de uma matriz mineralizada, devido a alterações nas fases iniciais da diferenciação (Nicolaije, Koedam e Leeuwen, van, 2012; Nicolaije, Peppel, van de e Leeuwen, van, 2013). Com base nos resultados do nosso estudo e em referências na literatura, podemos concluir que a produção de ROS dentro de valores baixos, não só é benéfica como essencial para que ocorra diferenciação celular durante a dentinogênese reparadora e conseqüentemente formação de matriz mineralizada.

Ainda quanto à produção de peróxidos, o aumento que se verificou com todos os biomateriais pode ter repercussões a nível do seu efeito antimicrobiano. A atividade antibacteriana do hidróxido de cálcio está relacionada com a libertação de iões hidroxilo em ambiente aquoso. Estes iões são espécies radicalares altamente oxidantes, com extrema reatividade química com as biomoléculas, de modo intenso e indiscriminado. No entanto, esta ação indiscriminada afeta, também, a atividade mitocondrial das culturas celulares em testes de citotoxicidade, como verificado nos resultados discutidos anteriormente. Os efeitos antibacterianos dos agregados trióxidos minerais não são, ainda, muito conhecidos. Estes materiais, quando hidratados, formam um gel de silicato que produz hidróxido de cálcio, parecendo ter um mecanismo de ação antibacteriano semelhante ao hidróxido de cálcio (Poggio *et al.*, 2014).

Se por um lado, o tratamento com o ProRoot®MTA realizado em condições anaeróbicas, não levou à produção de ROS, o que permitiu concluir que a atividade antimicrobiana destes biomateriais se deve à sua capacidade de produzir peróxidos e o seu efeito é traduzido na degradação do DNA bacteriano (Ribeiro *et al.*, 2010). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado que, em meio aeróbico, os agregados trióxidos minerais conseguem gerar espécies reativas de oxigénio que, como referido atrás, produzem uma atividade antibacteriana semelhante ao hidróxido de cálcio. No entanto, em condições anaeróbicas, observa-se um decréscimo acentuado da produção de radicais livres (Cabiscol, Tamarit e Ros, 2000; Ribeiro *et al.*, 2010).

Alguns autores referem que os tratamentos com a formulação cinzenta do ProRoot®MTA levaram à diminuição dos níveis de ROS, o que se pode dever ao aumento do pH associado à libertação de iões cálcio do biomaterial (Eid *et al.*, 2014). De facto, outros autores já tinham

referido que a produção diminuída de ROS está relacionada com o pH extracelular (Baldini *et al.*, 2003; Shu *et al.*, 1997). Foi referido, também, que os tratamentos com cimentos à base de silicato tricálcico e MTA apresentam uma baixa produção de ROS, sugerindo que se deve ao aumento do pH após a libertação de hidróxido de cálcio destes cimentos, o que é corroborado por outros estudos.

Noutros estudos com os agregados trióxidos minerais, alguns autores estudaram o efeito da clorhexidina e do hipoclorito de sódio sobre as culturas celulares, concluindo que estes produtos aumentam a capacidade antimicrobiana dos biomateriais, mas aumentam também a sua citotoxicidade (Jafarnia *et al.*, 2009).

No nosso estudo, a morfologia celular foi mantida nas células submetidas aos tratamentos com WhiteProRoot®MTA e com Biodentine™, observando-se uma coexistência entre as partículas dos materiais e as células em cultura, com a internalização de algumas delas. Nos tratamentos com Life® verificou-se uma alteração da morfologia compatível com a morfologia de células em apoptose, o que corrobora os resultados dos nossos ensaios anteriores que demonstram uma diminuição drástica das células vivas com um aumento da morte celular por esta via.

A morfologia celular de uma linha de fibroblastos gengivais foi estudada com recurso a microscopia eletrónica de varrimento e verificou-se a ausência de alterações após os tratamentos com ProRoot®MTA e com Biodentine™, aumentando o número de células aderentes à superfície dos biomateriais ao longo do tempo com estabelecimento de junções intercelulares (Lessa *et al.*, 2010). No entanto, estudos com um cimento de ionómero de vidro mostraram resultados diferentes, com diminuição do número de células aderentes, presença de formas arredondadas com sinais de vacuolização (Zhou *et al.*, 2013). Por outro lado, noutro estudo com recurso à mesma metodologia, verificou-se uma modificação da morfologia celular após tratamento com ProRoot®MTA, com uma constrição do citoplasma, enquanto com o tratamento com Biodentine™ não houve qualquer alteração (Nuñez *et al.*, 2014). Outros estudos corroboram esta ausência de alterações morfológicas em culturas celulares tratadas com o Biodentine™ (Nikfarjam *et al.*, 2016) e com o ProRoot®MTA (Paranjpe, Zhang e Johnson, 2010).

As células tipo-odontoblasto, nomeadamente as células MDCP-23, expressam diversas proteínas precursoras do processo de mineralização (About, 2011). A fosfatase alcalina e a sialoproteína da dentina são exemplos dessas proteínas, o que se verificou no presente estudo.

A fosfatase alcalina é referida como uma glicoproteína presente na superfície da célula que está envolvida na mineralização, sendo reconhecida como um marcador da diferenciação osteoblástica (About, 2011; Chang *et al.*, 2014). Neste estudo, verificou-se o aumento da expressão do gene da fosfatase alcalina assim como o aumento da sua síntese após os tratamentos com WhiteProRoot[®]MTA e com Biodentine[™]. No entanto, o aumento é mais acentuado nos tratamentos com Biodentine[™] e diretamente dependente da concentração. Nos tratamentos com Life[®] verifica-se o oposto, isto é, não há expressão do gene da fosfatase alcalina nem síntese da proteína.

A fosfatase alcalina é um marcador inicial da odonto/osteogénese e tem sido proposto por alguns autores como um estimulante da mineralização, por proporcionar fosfato ou por degradar o pirofosfato inorgânico. Estes autores referem uma correlação entre altos níveis de fosfatase alcalina e o aumento dos nódulos mineralizados (Lee *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014; Semeghini *et al.*, 2012). Alguns autores relatam que quando associado a proteínas morfogenéticas do esmalte, os tratamentos com cimentos à base de MTA aumentam a expressão de fosfatase alcalina e a formação de depósitos de cálcio, não se sabendo, no entanto, qual o mecanismo pelo qual estas proteínas atuam nos processos de diferenciação e de mineralização (Min, Yang e Kim, 2009). Outros autores referem que com o ProRoot[®]MTA e particularmente com o Biodentine[™] após 48 horas, ocorre um aumento da expressão do gene da fosfatase alcalina (Daltoé *et al.*, 2016). Resultados semelhantes são referidos por outros estudos, com aumento da expressão desse gene em tratamentos com ambos os materiais (Chang *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2012). Numa avaliação de dois cimentos à base de agregados trióxido mineral observaram-se diferenças entre eles, com maior expressão de fosfatase alcalina e formação de depósitos de cálcio com o ProRoot[®]MTA (Paranjpe, Zhang e Johnson, 2010) relativamente ao MTA Angelus[®] (Chang *et al.*, 2014). No entanto, outros estudos demonstraram a diminuição da expressão da fosfatase alcalina após 11 dias de cultura celular,

o que pode ser um indicador da maturação odontoblástica, corroborando o seu envolvimento, apenas, como marcador inicial de mineralização (Zanini *et al.*, 2012)

Nalguns estudos, a proteína DMP-1 foi expressa em maior quantidade no período inicial de cultura nas células tipo-odontoblasto do que nas células indiferenciadas da polpa dentária. Esta proteína, produzida pelas células tipo-odontoblasto, é detetada ao longo da interface polpa-dentina reparadora (Semeghini *et al.*, 2012). Outras proteínas como a osteopontina, mesmo não sendo marcadores específicos da diferenciação odontoblástica, podem ser normalmente expressas durante a dentinogénese reparadora por odontoblastos funcionais, secretando matriz dentinária, e estando presente nas regiões perinucleares e citoplasmáticas (Semeghini *et al.*, 2012). Por outro lado, a DSP é detetada nos odontoblastos e pré-ameloblastos e, consequentemente, no tecido dentinário, mas não noutros tecidos como no esmalte, no osso, no músculo ou na cartilagem (Hanks *et al.*, 1998; Semeghini *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 1998). Alguns estudos referem que a proteína DSP pode ser secretada através dos processos odontoblásticos diretamente na zona de mineralização, na junção pré-dentina-dentina. A presença da DSP na pré-dentina e a sua produção por odontoblastos jovens pode ser um indicador do seu papel na formação e no desenvolvimento inicial da dentina. Esta é uma proteína presente no citoplasma.

No nosso estudo, a sua avaliação por imunocitoquímica com deteção por microscopia ótica demonstrou a sua presença no citoplasma das células MDCP-23. Nos tratamentos com WhiteProRoot[®]MTA e com Biodentine[™] verificou-se um aumento da sua expressão diretamente dependente do aumento da concentração. Nos tratamentos com Biodentine[™] observou-se um aumento da sua expressão relativamente aos outros biomateriais, como já referido noutros estudos (Jeanneau *et al.*, 2017). Nos tratamentos com Life[®] verificou-se uma diminuição do número de células, com alterações acentuadas da morfologia celular e sem síntese de proteína, corroborando os resultados dos ensaios anteriores. Alguns autores demonstraram o aumento da expressão de DSP em relação ao controlo após o tratamento com ProRoot[®]MTA (Chang *et al.*, 2014; Masuda *et al.*, 2010; Paranjpe, Zhang e Johnson, 2010). Outros compararam a expressão após os tratamentos com ProRoot[®]MTA e com Biodentine[™], verificando um aumento de ambos relativamente ao controlo, mas com maior expressão no tratamento com Biodentine[™], como verificado nos resultados do nosso estudo (Jung *et al.*, 2015).

Alguns autores observaram, através da marcação de áreas ricas em cálcio com o *Alizarin Red*, a presença de nódulos mineralizados nos frascos de culturas celulares com MDPC-23, formando uma matriz mineralizada (Semeghini *et al.*, 2012). Este ensaio colorimétrico é sensível e permite a quantificação dos depósitos de cálcio. Os resultados da fase de mineralização corroboraram esta característica das células tipo-odontoblasto MDCP-23, como se observa na análise qualitativa. Verificou-se um aumento da formação de depósitos de cálcio nos tratamentos com WhiteProRoot®MTA e com Biodentine™, dependente da concentração e com maior intensidade nos tratamentos do último biomaterial referido. A avaliação quantitativa discriminou diferenças significativas entre os dois biomateriais. O tratamento com Life®, na sequência dos resultados anteriores, não revelou formação dos depósitos de cálcio concomitantes com as alterações de morfologia celular.

Alguns estudos mostraram um aumento da área dos depósitos de cálcio de cerca de 60% nas culturas tratadas com ProRoot®MTA, não se observando qualquer formação de depósitos em culturas tratadas com cimento à base de hidróxido de cálcio (Yasuda *et al.*, 2008). Verificou-se um aumento da área de nódulos calcificados tanto em culturas tratadas com ProRoot®MTA, como com Biodentine™; para ambos os biomateriais, a estimulação dos odontoblastos para diferenciação e formação de depósitos de cálcio ocorre através da ativação da via MAPK (Jung *et al.*, 2015).

A citotoxicidade do tratamento com os biomateriais Biodentine™ e WhiteProRoot®MTA, sob as condições experimentais investigadas, varia de moderada a fraca, sendo muito inferior aos valores de 40 a 45% admitidos na norma ISO. Isto é semelhante ao que parece ocorrer *in vivo* no tecido pulpar, quando estes materiais são utilizados para proteções pulpar diretas. As camadas celulares externas em contato com o material de proteção atuam, presumivelmente, como filtro ou barreira, protegendo as camadas internas. Este comportamento associado à depuração pulpar, necessariamente diminui a magnitude da citotoxicidade. Este facto explica porque é que, apesar da natureza cáustica de alguns destes materiais, está demonstrada a sua eficácia e sucesso clínico. As diferenças significativas demonstradas nos diferentes ensaios entre o cimento à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de agregados trióxido minerais e silicatos tricálcico são, claramente, devido às diferenças estruturais dos seus

componentes básicos e, conseqüentemente, às diferentes reações bioquímicas induzidas pelos mesmos nos tecidos. Está estabelecido que os agregados de trióxido minerais induzem a formação de uma barreira de tecido duro com uma maior espessura do que os materiais à base de hidróxido de cálcio, acompanhada de uma menor inflamação dos tecidos adjacentes. Além disso, o tecido pulpar tem células progenitoras capazes de se diferenciarem em células tipo-odontoblasto formadoras de dentina. Este mecanismo é facilitado pelos agregados de trióxido minerais por indução da secreção de proteínas morfogenéticas e fatores de crescimento como a BMP-2 e o TGF- β 1 (Poggio *et al.*, 2014, 2014). A tecnologia por detrás do processo de fabrico do biosilicato, constituinte principal do Biodentine™, remove as impurezas metálicas presentes noutros cimentos. A reação de presa envolve a hidratação do silicato tricálcico e a produção de um gel à base de silicato de cálcio e hidróxido de cálcio que em contato com os iões fosfato tem a capacidade de precipitar um composto semelhante à hidroxiapatite (Nuñez *et al.*, 2014). Alguns estudos referem mesmo que, devido à sua baixa citotoxicidade e à sua alta capacidade bio-indutora, o Biodentine™ pode ser considerado o material ideal para o tratamento de exposições pulpares (Poggio *et al.*, 2014). O mecanismo para a estimulação da reparação pela deposição do tecido mineralizado depende do pH e da capacidade do cimento de silicato tricálcico para libertar vários iões. Os iões de cálcio extracelular representam um fator potente que afeta a função celular e tem efeitos significativos na proliferação e na diferenciação de células. Sabe-se que os iões cálcio estão envolvidos numa série de vias de sinalização da proliferação. Os iões de cálcio libertados dos cimentos de silicato tricálcico ativam a via de sinalização da MAPK induzindo, assim, a expressão do RNA mensageiro dos genes associados à diferenciação e à mineralização odontoblástica nos odontoblastos (Nuñez *et al.*, 2014; Rathinam *et al.*, 2015). Isso mesmo foi observado no nosso estudo, com um aumento considerável da síntese de fosfatase alcalina, da expressão do gene da fosfatase alcalina, da síntese de sialoproteína da dentina e da formação dos depósitos de cálcio. Estes aumentos, da produção de proteínas específicas da fase de diferenciação e a formação de depósitos de cálcio, estão correlacionados uns com os outros de forma proporcional. Nos tratamentos com os biomateriais WhiteProRoot®MTA e Biodentine™, nas concentrações mais elevadas, observou-se esta correlação, estando esta muito aumentada nos tratamentos com o Biodentine™ (Loison-Robert *et al.*, 2018).

Assim, o Life[®] revelou-se um biomaterial com efeitos citotóxicos no tecido pulpar, pelo que se justifica o uso de outros materiais que apresentam melhores propriedades de biocompatibilidade. Por outro lado o WhiteProRoot[®]MTA e o Biodentine[™] apresentam características de bioactividade e biocompatibilidade, preservando a proliferação e viabilidade celular, potenciando a diferenciação e induzindo a mineralização. Estas características confirmam o seu potencial de aplicação clínica na regeneração do complexo dentino-pulpar

CAPÍTULO VI — ESTUDOS *IN VIVO*

A lacuna existente a nível da influência do microambiente, em especial a vascularização e os fluídos internos, e dos fatores de crescimento endógenos, sem os quais não é possível responder à questão de investigação, conduziu à necessidade de realizar os estudos *in vivo*.

Esta necessidade surgiu após o estudo de biocompatibilidade a nível celular realizado *in vitro* utilizando os 3 biomateriais, o Life[®], o WhiteProRoot[®]MTA e o Biodentine[™], em que se verificou que o material Life[®] diminuiu significativamente a proliferação celular, alterou o ciclo celular e, como consequência, provocou a morte celular por apoptose e por necrose. Estas alterações fizeram com que se considerasse um material citotóxico e não biocompatível, pelo que não foi selecionado para o estudo animal.

Desta forma, o estudo *in vivo* em modelo animal pretendeu avaliar o efeito bioativo do Biodentine[™], nomeadamente a formação de dentina reparadora e a diminuição dos efeitos inflamatórios ao longo do tempo, após a exposição pulpar. Para esta avaliação foi efetuada a comparação com material atualmente considerado como *gold standard*, o WhiteProRoot[®]MTA.

Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, respeitando todas as disposições legais em vigor, após aprovação pela ORBEA (Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal) e da DGAV (Direção Geral de Alimentação e Veterinária) (anexo II).

Desenvolvimento do modelo animal

Para a realização dos estudos *in vivo* foram utilizados 45 ratos macho da estirpe Wistar Han, com 12 a 14 semanas de idade, com massa média de $205 \pm 30,91$ grama. Durante o período em que decorreram os trabalhos experimentais, os animais foram mantidos em condições laboratoriais, de acordo com a legislação em vigor (Decreto-Lei n.º 113/2013, de 7 de agosto de 2013 que transpõe a Diretiva n.º 2010/63/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de setembro de 2010) em regime *ad libitum*. Durante todo o tempo em que decorreu a experiência, foram efetuados registos semanais da massa do animal e registos diários de qualquer alteração comportamental visível, tendo em conta os *end points* definidos para a experiência.

O modelo animal desenvolvido de exposição pulpar foi realizado utilizando os primeiros molares mandibulares como se observa na Figura 29.



Figura 29: Registo fotográfico da preparação do animal na fase experimental. Imagem da hemimandíbula esquerda correspondente ao local de intervenção dos grupos teste onde se observam o 1º, 2º e 3º molares.

Após a desinfecção com clorhexidina a 0,12% da superfície dentária dos dentes, as exposições pulpares foram realizadas nos primeiros molares mandibulares com broca adiamantada esférica 008 em contra-ângulo multiplicador e finalizada com auxílio de uma lima K 10. As cavidades preparadas foram irrigadas com hipoclorito de sódio a 2% (DentaFlux,

Madrid, Espanha) seguido de clorohexidina a 2% (Corsodyl®Original Mouthwash, GlaxoSmithKline, Brentford, UK) com seringa 5ml e agulha de 30G. Após esta irrigação da cavidade, a hemóstase realizou-se com bola de algodão esterilizada. Para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina a 77% (25mg/Kg) e clorpromazina a 33% (25-40mg/Kg) via intraperitoneal.

Tratamento com biomaterial

Após o desenvolvimento do modelo animal, como descrito atrás, foram utilizados os 45 ratos *Wistar Han*, que foram divididos em 4 grupos, 2 grupos controlo e dois grupos teste. Todos os animais manipulados foram pesados e anestesiados com Ketamina a 77% (25 mg/Kg) e clorpromazina a 33% (25 a 40mg/Kg) via intraperitoneal.

Assim, no grupo controlo negativo, grupo 1, não foi realizada qualquer intervenção, sendo constituído por todos os primeiros molares mandibulares direitos de todos os animais manipulados.

As intervenções nos grupos controlo positivo e testes foram todas efetuadas nos primeiros molares mandibulares esquerdos dos animais. No grupo controlo positivo, grupo 2, foi efetuada a exposição pulpar sem tratamento. Após a realização da exposição pulpar foram efetuadas as manobras de irrigação e de hemóstase e restauradas as cavidades com um cimento de ionómero de vidro Ketac™ Fil Plus Aplicap™ (3M ESPE, St. Paul, USA). Estas restaurações foram efetuadas com o auxílio da ponta aplicadora do produto, com uma espátula de inserção e brunidores esterilizados. Os animais foram monitorizados com a cavidade oral aberta até a completa polimerização do cimento de ionómero de vidro.

Nos dois grupos teste foram utilizados os biomateriais teste, o WhiteProRoot®MTA e o Biodentine™. Em ambos os grupos, após a realização da exposição pulpar, da irrigação cavitária e da hemóstase como foi descrito atrás, foram aplicados os biomateriais correspondentes. No grupo 3, o WhiteProRoot® MTA foi manipulado e espatulado de acordo com as indicações do fabricante sobre um bloco de papel de seda, recorrendo a uma espátula de cimentos e aplicado na cavidade sobre a zona da exposição pulpar com o auxílio de um brunidor esterilizado. As

cavidades foram restauradas com um cimento de ionómero de vidro Ketac™ Fil Plus Aplicap™, com o auxílio da ponta aplicadora do produto, com uma espátula de inserção e brunidores esterilizados. Os animais foram monitorizados com a cavidade oral aberta até à completa polimerização do cimento de ionómero de vidro. No grupo 4, os procedimentos efetuados foram semelhantes aos descritos atrás para a concretização da exposição pulpar: irrigação da cavidade e hemóstase, tendo sido colocado o biomaterial Biodentine™ à semelhança do que foi efetuado no grupo 3 com o WhiteProRoot®MTA. A restauração da cavidade foi efetuada de forma semelhante. A manipulação do Biodentine™ foi realizada conforme as instruções do fabricante, colocando a solução aquosa na cápsula que acondiciona o pó e submetendo-o a vibração durante 30 segundos a 4000 rpm (Ventura Mix). Após a intervenção, todos os animais foram monitorizados 4 vezes por dia com colocação de comida húmida na gaiola. Foi-lhes fornecida analgesia com ibuprofeno (10mg/kg, de 8 em 8 horas nas 24h após intervenção).

Foram occisados 15 animais, correspondente a 5 animais de cada grupo, aos 3, 7 e 21 dias após o procedimento cirúrgico, por sobredosagem anestésica.

Aquisição de imagem molecular por Medicina Nuclear

A medicina nuclear constitui um meio de diagnóstico e de terapêutica que utiliza a radiação ionizante emitida por átomos instáveis. Os radionuclídeos podem ligar-se a moléculas, constituindo os radiofármacos e, recorrendo a instrumentação específica, é possível observar a sua biodistribuição *in vivo* do radiofármaco. Assim, a câmara-gama surge como um equipamento que permite a localização e conseqüente quantificação dos radiofármacos, possibilitando aceder, de forma não invasiva à informação funcional dependente da via metabólica específica em que o radiofármaco participa (Ell e Gambhir, 2004; Ferreira, 2009; Harvey Ziessman e O'Malley, 2013; Paulo, 2015; Simon R., Sorenson e Phelps, 2003; Zolle, 2006).

A maioria dos radiofármacos consiste na combinação de um radionuclídeo com um componente biologicamente ativo. Um dos radionuclídeos mais utilizado em imagiologia nuclear é o tecnécio-99m (^{99m}Tc), obtido através de um gerador de molibdénio-99 (^{99}Mo)/ ^{99}Tc), sistema que contém um radionuclídeo pai com um período de semi-desintegração ($T_{1/2}$) longo (^{99}Mo ;

$T_{1/2}=66$ horas) e que dá origem a um radionuclídeo filho com um período de semi-desintegração curto (^{99m}Tc ; $T_{1/2}=6$ horas). No gerador, o radionuclídeo encontra-se adsorvido numa coluna de alumina obtendo-se o ^{99m}Tc por simples eluição com soro fisiológico, sob a forma de pertecnetato de sódio em solução aquosa, estéril e apirogénica (Ell e Gambhir, 2004; Ferreira, 2009; Harvey Ziessman e O'Malley, 2013; Paulo, 2015; Simon R., Sorenson e Phelps, 2003; Zolle, 2006).

Neste estudo aos 3, aos 7 e aos 21 dias após a terapêutica com os biomateriais os animais, após serem anestesiados com uma solução de Ketamina 50 mg/ml (Ketalar[®], Parke-Davis, Barcelona, Espanha), receberam a administração de hidroximetileno difosfonato marcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc -HMDP). A captação dos difosfonatos pelo osso permite obter uma imagem cintigráfica que depende tanto do fluxo sanguíneo local como da atividade osteoblástica. Assim, o radiofármaco, após administração, é incorporado nos cristais de hidroxiapatite na superfície óssea (Lancelot, Giammarile e Tescaru, 2016). Tendo em conta a biodistribuição, o radiofármaco ^{99m}Tc -HMDP foi utilizado neste estudo devido à alta afinidade pela hidroxiapatite e pelo facto do radionuclídeo ^{99m}Tc apresentar uma energia de 140 keV, ideal para uma imagem de alta qualidade, bem como um período de semi-desintegração de 6 horas (Lancelot, Giammarile e Tescaru, 2016; O'Sullivan e Cook, 2002). Noventa minutos após a administração intravenosa do radiofármaco ($9,2\pm 0,31$ MBq) os animais foram occisados e posteriormente removidas as mandíbulas. Em todos os espécimes foi adquirida uma imagem estática com uma matriz de 256x256 Zoom1, durante 2 minutos.

Após a aquisição da imagem, o processamento foi realizado na estação de processamento Xeleris através do desenho de regiões de interesse (do inglês *regions of interest* - ROIs). Da região de interesse desenhada para cada hemi-mandíbula foram obtidos os valores das contagens máximas na hemi-mandíbula intervencionada (grupos 2, 3 e 4) e das contagens médias na hemi-mandíbula contralateral (grupo 1), com objetivo de calcular a razão entre hemi-mandíbula intervencionada e a hemi-mandíbula contralateral.

Análise histológica

Imediatamente após a occisão, na necrópsia foram recolhidas amostras de baço, de fígado, de pulmão e da mandíbula. A colheita destes órgãos de todos os animais foi realizada cumprindo os tempos definidos para que não houvesse alterações *post-mortem*. Assim, a colheita foi efetuada em menos de 20 minutos após a occisão. As amostras de órgãos recolhidas foram acondicionadas, catalogadas e fixadas em formaldeído neutro tamponado a 10%. Como se trata de um fixador relativamente lento, os fragmentos puderam permanecer durante várias horas sem alterações acentuadas, mas não excedendo as 24 a 36 horas, dependendo da espessura dos fragmentos. Os fragmentos mais pequenos, com menos de 1 mm de espessura, foram processados em primeiro lugar, cumprindo os tempos definidos. Após o período de fixação, estas foram processadas segundo a orientação que se programou, ficando o plano da mucosa perpendicular ao plano de corte. O processamento realizou-se sob a forma convencional, tendo sido desidratadas em concentrações crescentes de etanol e, posteriormente, incluídas em parafina. Efetuaram-se cortes de 5 μm de espessura e procedeu-se à sua coloração com H&E (Hematoxilina & Eosina).

As amostras das hemimandíbulas foram também acondicionadas, catalogadas e fixadas em formaldeído neutro tamponado a 10% durante 7 dias, lavadas em água corrente e, posteriormente, descalcificadas com a solução de EDTA em concentrações crescentes, à temperatura de 4°C. Em seguida foi realizada a desidratação das amostras, numa bateria ascendente de álcoois e posterior inclusão em parafina, como se pode observar na Figura 30 (Kuratate *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017; Shimazu, Nanci e Aoba, 2002; Silva *et al.*, 2017).

Foram realizados cortes longitudinais no sentido vestíbulo-lingual, com cerca de 5 μm de espessura e intervalos de 70 μm , correspondentes à região da exposição e proteção pulpar. Procedeu-se à preparação das lâminas para coloração com 3 técnicas distintas: hematoxilina-eosina (H&E), imunohistoquímica para deteção da DSP e *alizarin red S*.

Foi efetuada a coloração de H&E nas amostras, devido à sua simplicidade e à sua capacidade de permitir visualizar uma grande quantidade diferente de estruturas tecidulares. A hematoxilina cora de azul os núcleos, apresentando grande detalhe intranuclear. A eosina cora

o citoplasma das células e a maioria das fibras do tecido conjuntivo de forma e intensidade diferentes, variando do rosa ao laranja ou vermelho.

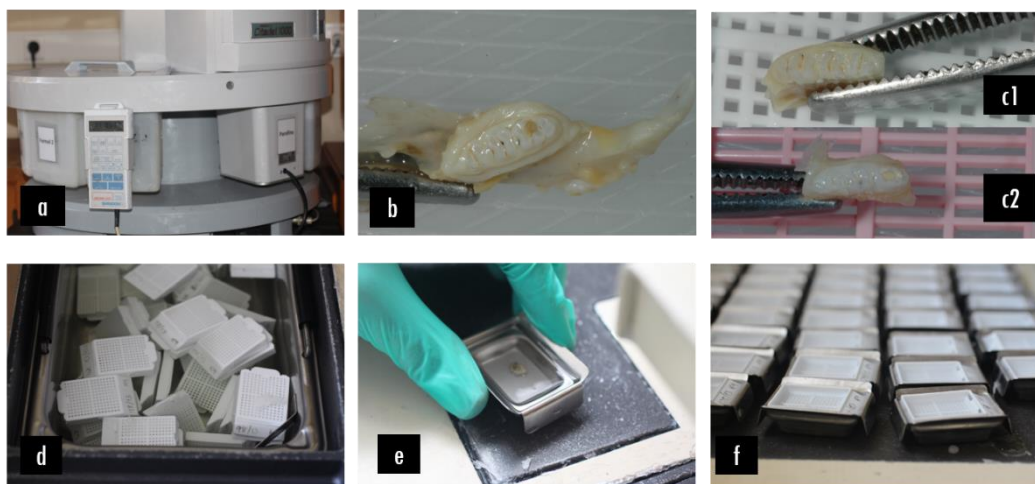


Figura 30: Registro fotográfico ilustrativo do processamento das amostras das hemimandíbulas, desde a fase de fixação (a) e descalcificação (b), seleção da zona de estudo (c1, amostra do grupo controle negativo; c2, amostra de um grupo teste), passando pela fase de desidratação (d), até à sua inclusão em parafina (e) para posterior preparação para microtomia (f).

O objetivo desta coloração foi a avaliação do infiltrado inflamatório, desde o grau e extensão à identificação de algumas células associadas; a avaliação da desorganização do tecido pulpar, desde o tecido normal até à desorganização total da morfologia do tecido com necrose do mesmo; e a avaliação da formação de dentina reparadora, desde a ausência de ponte dentinária até à sua edificação completa. Assim, a avaliação qualitativa efetuada a partir das imagens obtidas através da coloração com a H&E baseou-se na classificação da Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5, de acordo com a versão modificada das ISO 10993 e 7405 (Souza Costa, de *et al.*, 2001).

A técnica de coloração por imunohistoquímica foi utilizada para observação da expressão de DSP. As secções foram desparafinizadas com xilol, hidratadas numa série decrescente de concentrações de etanol, lavadas com PBS antes de serem submetidas ao anticorpo primário

[DSP(M-20) *Antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Europe, 1:100] e, posteriormente, ao anticorpo secundário (*Polyclonal Rabbit Anti-goat immunoglobulins/HRP*, Dako, Denmark, 1:100).

Tabela 3: Classificação do infiltrado inflamatório celular (Liu *et al.*, 2017; Souza Costa, de *et al.*, 2001)

Infiltrado inflamatório (grau)	Caracterização do infiltrado inflamatório
Grau 0	Sem sinais inflamatórios e sem a presença ou com o aparecimento de poucas células inflamatórias na área pulpar correspondente à zona de exposição.
Grau 1	Infiltrado inflamatório ligeiro com a presença de células, como os polimorfonucleares neutrófilos (do inglês <i>polymorphonuclear leucocytes</i> – PMNLs) e os leucócitos mononucleares (do inglês <i>mononuclear leucocytes</i> – MNLs).
Grau 2	Infiltrado inflamatório celular moderado envolvendo o tecido pulpar coronário.
Grau 3	Infiltrado inflamatório celular severo envolvendo o tecido pulpar coronário ou com características de abscesso.

Tabela 4: Classificação da desorganização do tecido pulpar (Liu *et al.*, 2017; Souza Costa, de *et al.*, 2001)

Desorganização tecidual	Caracterização
Grau 0	Tecido normal.
Grau 1	Desorganização da camada de odontoblastos, mas tecido pulpar coronário normal.
Grau 2	Total desorganização da morfologia do tecido pulpar.
Grau 3	Necrose pulpar.

Tabela 5: Classificação da formação de dentina reparadora (Liu *et al.*, 2017; Souza Costa, de *et al.*, 2001)

Formação de dentina reparadora	Caracterização
Grau 0	Ausência.
Grau 1	Deposição ligeira de tecido duro imediatamente abaixo da zona de exposição.
Grau 2	Deposição moderada de tecido duro imediatamente abaixo da zona de exposição.
Grau 3	Deposição intensa de tecido duro imediatamente abaixo da zona de exposição, característico de uma ponte dentinária completa.

O complexo anticorpo-antigénio foi detetado por ativação da peroxidase (*Substrate Buffer*, Dako, Denmark) e cromogéneo (*DAB⁺ Chromogen*, Dako, Denmark).

A contra-coloração foi efetuada com a hematoxilina. O objetivo desta coloração foi a avaliação da mineralização através da produção de DSP após os tratamentos com os biomateriais (Kim *et al.*, 2016; Kuratate *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012; Shima *et al.*, 2013).

Foi ainda efetuada, uma terceira técnica de coloração para detetar os depósitos de cálcio formado, através da coloração com o *alizarin red S*. A solução de *alizarin red S* utilizada foi obtida como já descrito nos materiais e métodos do estudo *in vitro*. O objetivo desta coloração foi permitir a avaliação da mineralização através da formação de depósitos de cálcio após os tratamentos com os biomateriais.

A observação microscópica de todas as secções histológicas coradas com as três técnicas foi efetuada com recurso à microscopia de luz num microscópio Nikon Eclipse NI. As fotografias foram obtidas a partir da câmara Nikon OS-Fi2 acoplada ao microscópio e, posteriormente, as imagens foram captadas e analisadas com recurso ao *software* NIS-Elements D. Foram obtidas fotografias com ampliação de 40x, de 100x e de 200x.

Resultados

Estudo funcional

Os resultados obtidos após a administração de ^{99m}Tc-HMDP revelaram que não existem diferenças com significado estatístico ($p > 0,05$), quando comparado cada grupo para cada tempo de 3, 7 e 21 dias, como podemos apreciar na Figura 31. Quando avaliadas em cada tempo as diferenças entre os três grupos com diferentes materiais, verificou-se que também não existem diferenças com significado estatístico ($p > 0,05$).

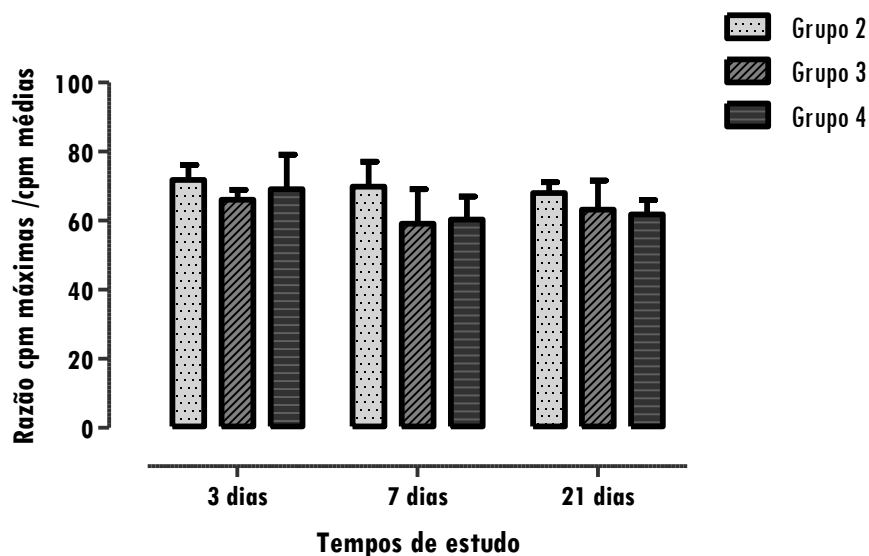


Figura 31: Gráfico representativo dos resultados obtidos com a imagem molecular após a administração de ^{99m}Tc -HMDP. Os valores apresentados representam a média e o desvio padrão da razão, obtidos entre as contagens máximas da hemi-mandíbula intervencionada e as contagens médias da hemi-mandíbula contralateral aos 3, 7 e 21 dias, de cada grupo intervencionado com diferentes biomateriais, Grupos 2, 3 e 4.

Terapêutica com biomaterial *in vivo*

As imagens representativas da histologia dos primeiros molares mandibulares dos grupos controlo e dos grupos testes nos vários períodos experimentais, podem ser observadas na Figura 32, Figura 33, Figura 34, Figura 35, Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39 e Figura 40.

A Figura 32 representa os cortes histológicos dos molares dos ratos do grupo 1, isto é, do grupo controlo negativo, após 21 dias de *follow up*. Na Figura 32-A, corada com H&E e com uma ampliação de 200x, é possível observar o tecido pulpar envolvido pelo tecido dentinário, onde são perceptíveis os túbulos dentinários. No tecido pulpar pode ser observada a monocamada externa de odontoblastos com uma forma tubular, e uma zona central com vários tipos de células, nomeadamente fibroblastos e células sanguíneas suportados por um tecido conjuntivo laxo. A Figura 32-B, processada por imunohistoquímica e com uma ampliação de 100x, permite observar a arquitetura anatómica geral da estrutura dentária de um molar, com o tecido pulpar rodeado pelo tecido dentinário formando a coroa dentária. Na Figura 32-C, corada com *alizarin red S* com uma ampliação de 200x, observa-se a monocamada de odontoblastos em estreita

relação com a camada mineralizada de dentina, onde é perceptível uma intensificação dos depósitos mineralizados.

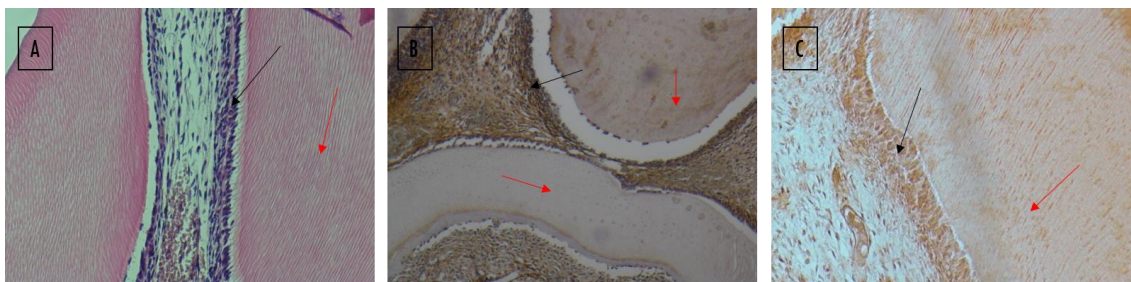


Figura 32: Imagens de cortes histológicos do grupo 1 aos 21 dias de follow-up, corados com: hematoxilina e eosina (H&E), por imunohistoquímica para a DSP e com alizarin red S. A imagem A foi corada com H&E e obtida com a ampliação 200x. A imagem B foi corada por imunohistoquímica para a DSP e obtida com a ampliação 100x. A imagem C foi corada com alizarin red S e obtida com a ampliação 200x. Seto preta - monocamada externa de odontoblastos com uma forma tubular; seto vermelha — dentina (túbulos dentinários).

A Figura 33 representa os cortes histológicos de todos os grupos controlos, negativo e positivo e, dos grupos testes, nos quais se efetuou a terapêutica com WhiteProRoot[®]MTA ou Biodentine[™], aos 3 dias de *follow-up*.

Nas imagens da Figura 33 correspondentes ao grupo controlo negativo, com uma ampliação de 40x e coradas com H&E, é possível observar uma arquitetura anatômica geral de um molar de rato com a zona coronária e radicular. A polpa dentária caracteriza-se por várias zonas anatômicas, sempre envolvida por um tecido mineralizado dentinário. A camada mais externa é uniforme em toda a periferia, com algumas diferenças pontuais decorrentes das diferentes zonas anatômicas, composta pelos odontoblastos que estão intimamente relacionados com o tecido mineralizado dentinário adjacente. Nas imagens coradas por imunohistoquímica e com o *alizarin red S* observa-se a marcação da presença de DSP e de depósitos de cálcio, respetivamente, nas zonas mineralizadas como o caso do tecido dentinário e em zonas adjacentes a estas, como na monocamada de odontoblastos.

Nas imagens da Figura 33 correspondentes ao grupo controlo positivo, com uma ampliação de 40x, é possível observar a arquitetura geral do molar com a zona de exposição pulpar no centro da coroa dentária. Observa-se nas três colorações a presença de um pólipo pulpar

formado a partir do tecido pulpar para a zona exposta, acompanhado de um intenso infiltrado inflamatório (grau 3) e de uma total desorganização do tecido (grau 3). Não é visível qualquer formação de tecido mineralizado, quer seja no interior do tecido pulpar ou adjacente à zona de exposição (grau 0).

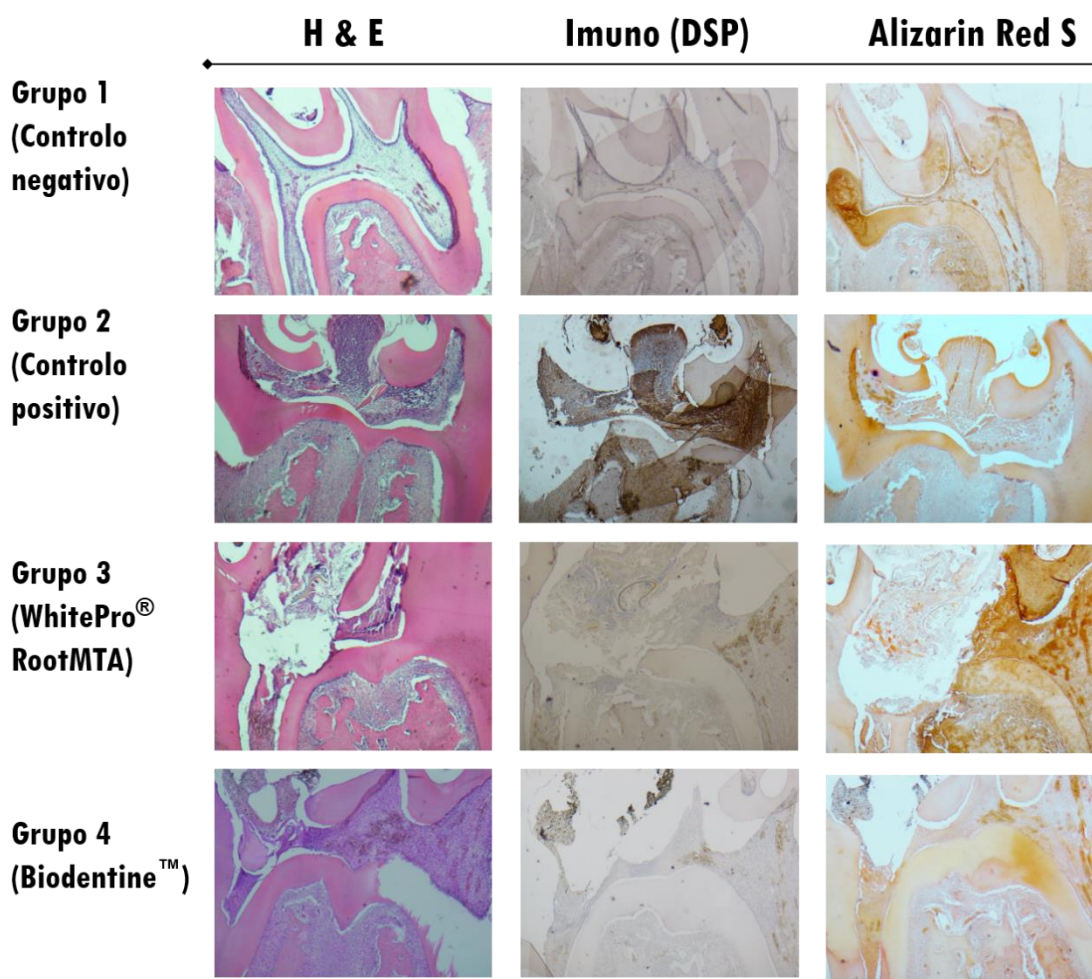


Figura 33: Imagens de cortes histológicos de todos os grupos de estudo aos 3 dias de follow-up, corados com hematoxilina e eosina (H&E) (coluna esquerda), por imunohistoquímica para a DSP (coluna central) e com alizarin red S (coluna direita). Todas as imagens foram obtidas com uma ampliação 40x.

Nas imagens da Figura 33 correspondentes ao grupo 3, coradas com H&E e com uma ampliação de 40x, no qual a terapêutica de proteção pulpar direta foi efetuada com o

WhiteProRoot®MTA, observa-se a presença do biomaterial utilizado na extensa zona de exposição, com a presença de infiltrado inflamatório intenso (grau 2) e com total desorganização do tecido pulpar (grau 2). As imagens de imunohistoquímica e com a coloração com o *alizarin red S*, para além de corroborarem os achados descritos, não mostram alterações da presença de DSP ou de depósitos de cálcio (grau 0). Na Figura 34 podem ser observados estes achados histológicos com uma ampliação de 100x. Na Figura 34-A observa-se uma total desorganização do tecido pulpar com um aumento da densidade do tecido conjuntivo laxo. Na Figura 34-B observa-se um aumento da deposição de cálcio no seio do tecido pulpar desorganizado. No entanto, nesta imagem pode ser observada uma zona de tecido pulpar com características normais, mantendo a integridade da camada de odontoblastos e sem sinais de infiltrado inflamatório.

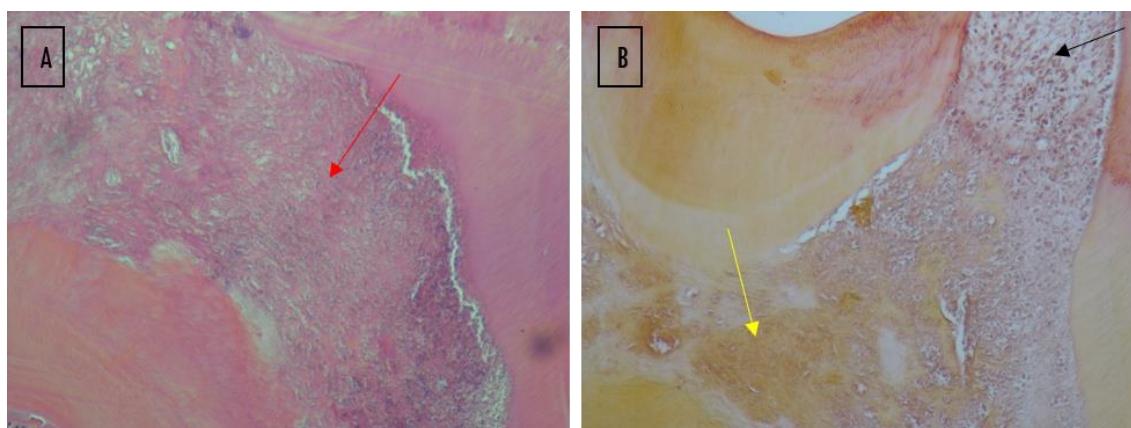


Figura 34: Imagens de cortes histológicos do grupo 3, no qual foi realizada a terapêutica com WhiteProRoot®MTA, aos 3 dias de *follow-up*. A imagem A foi corada com H&E e obtida com a ampliação 100x. A imagem B foi corada com *alizarin red S* e obtida com a ampliação 100x. Seta vermelha — tecido pulpar desorganizado com aumento do tecido conjuntivo laxo; seta amarela — tecido pulpar desorganizado com a presença de depósitos de cálcio; seta preta — zona correspondente a organização tecidual pulpar normal.

Nas imagens da Figura 33 correspondentes ao grupo 4 coradas com H&E, com uma ampliação de 40x, no qual a terapêutica de proteção pulpar direta foi efetuada com o Biodentine™, observa-se a presença do biomaterial utilizado na extensa zona de exposição, com a presença de um ligeiro infiltrado inflamatório (grau 1) com a presença de células como os

polimorfonucleares neutrófilos O tecido pulpar encontra-se desorganizado apenas na zona de exposição, com a manutenção da monocamada de odontoblastos fora desta área (grau 1). As imagens de imunohistoquímica e com a coloração com o *alizarin red S*, para além de corroborarem os achados descritos, não mostram alterações da presença de DSP ou de depósitos de cálcio (grau 0). Na Figura 35 podem observar-se os achados já descritos com uma ampliação de 100x.

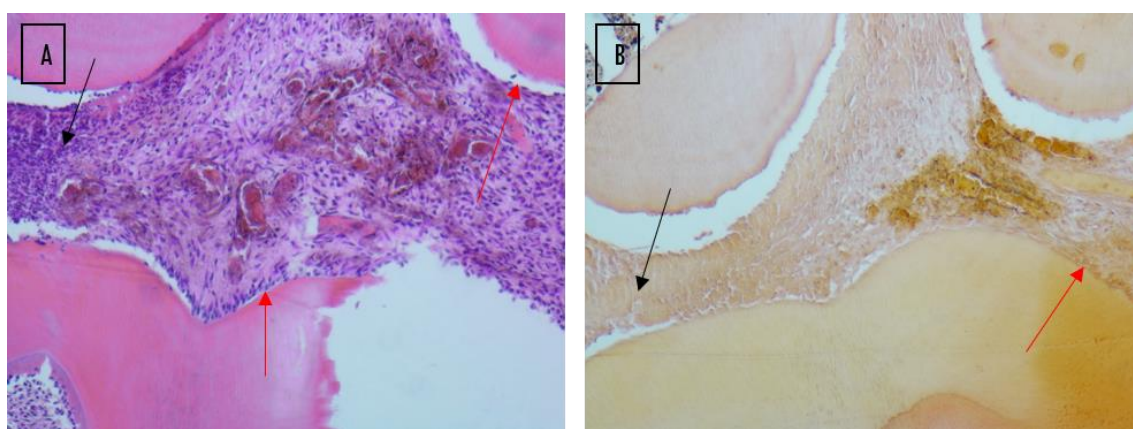


Figura 35: Imagens de cortes histológicos do grupo 4, no qual foi realizada a terapêutica com Biodentine™, aos 3 dias de *follow-up*. A imagem A foi corada com H&E e obtida com a ampliação 100x. A imagem B foi corada com *alizarin red S* e obtida com a ampliação 100x. Seta preta - tecido pulpar desorganizado com a presença de um infiltrado inflamatório ligeiro; seta vermelha - monocamada de odontoblastos integra.

A Figura 36 representa os cortes histológicos de todos os grupos controlos, negativo e positivo, e dos grupos testes, nos quais se efetuou a terapêutica com WhiteProRoot® MTA ou com Biodentine™, após 7 dias de *follow-up*.

Nas imagens da Figura 36 correspondentes ao grupo controlo negativo, com uma ampliação de 40x, é possível observar a arquitetura geral anatómica de um molar de rato com a zona coronária e radicular, semelhante ao observado no *follow-up* dos 3 dias.

Nas imagens da Figura 36 correspondentes ao grupo controlo positivo, com uma ampliação de 40x, é possível observar a arquitetura geral do molar com zona de exposição pulpar no centro da coroa dentária. Tal como no *follow-up* dos 3 dias, observa-se a presença de um pólipo pulpar, acompanhado de uma intenso infiltrado inflamatório (grau 3) e de uma total desorganização do

tecido (grau 3). Não é visível qualquer formação de tecido mineralizado, quer seja no interior do tecido pulpar ou adjacente à zona de exposição (grau 0).

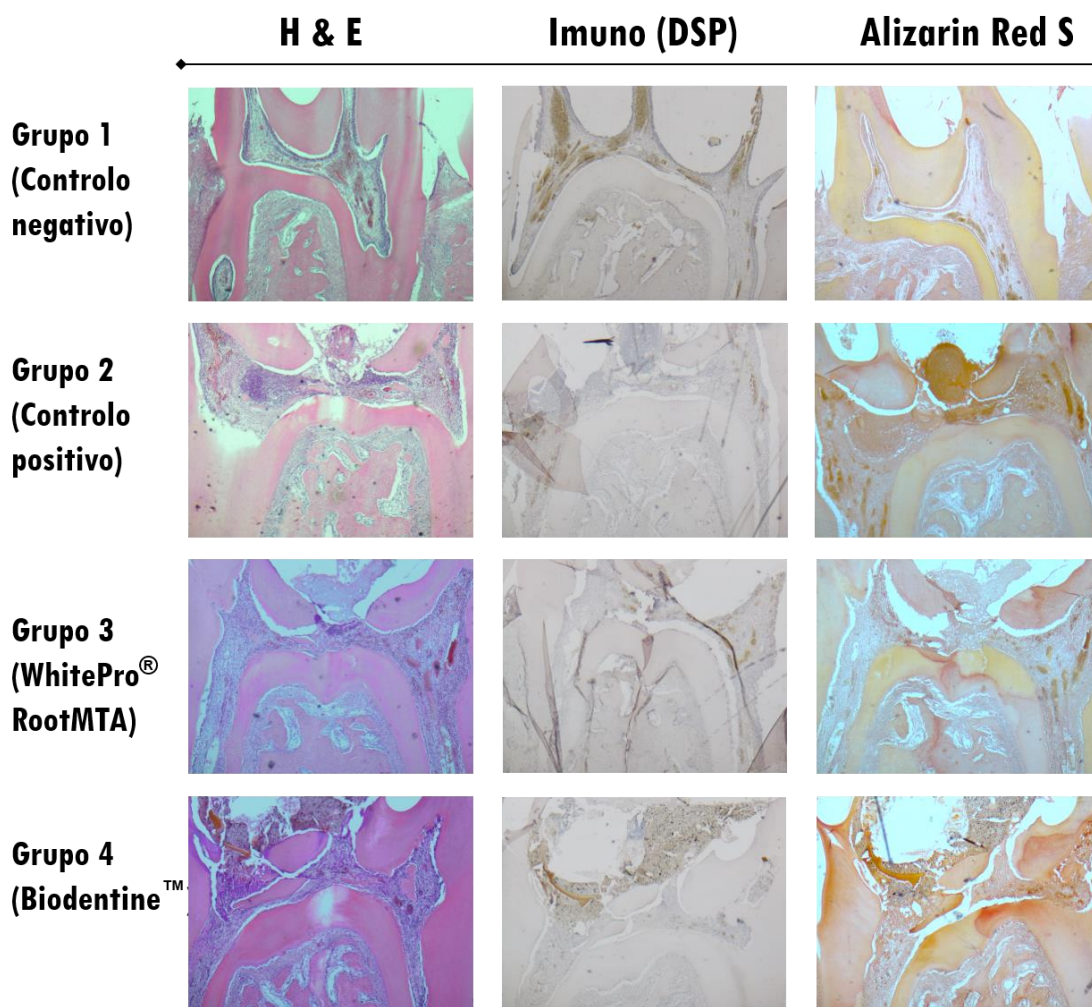


Figura 36: Imagens de cortes histológicos de todos os grupos de estudo aos 7 dias de follow-up, corados com hematoxilina e eosina (H&E) (coluna esquerda), por imunohistoquímica para a DSP (coluna central) e com alizarin red S (coluna direita). Todas as imagens foram obtidas com uma ampliação 40x.

Nas imagens da Figura 36 correspondentes ao grupo 3, com uma ampliação de 40x, nos quais a terapêutica de proteção pulpar direta foi efetuada com o WhiteProRoot[®]MTA, coradas com H&E observa-se a presença de infiltrado inflamatório ligeiro (grau 1) e sem desorganização da morfologia do tecido pulpar, com exceção da zona exposta (grau 1). As imagens de

imunohistoquímica e com a coloração com o *alizarin red S*, para além de corroborarem os achados descritos, não mostram alterações da presença de DSP ou de depósitos de cálcio (grau 0). Na Figura 37 podem ser observados estes achados histológicos com uma ampliação de 100x. Na Figura 37-A observa-se a presença de infiltrado inflamatório ligeiro com polimorfonucleares neutrófilos, a manutenção da morfologia tecidual e a presença de alguns depósitos mineralizados perto da zona de exposição, sem, no entanto, ser característico de uma ponte dentinária completa. Na Figura 37-B observa-se um aumento da deposição de cálcio nas zonas já identificadas pela coloração de H&E.

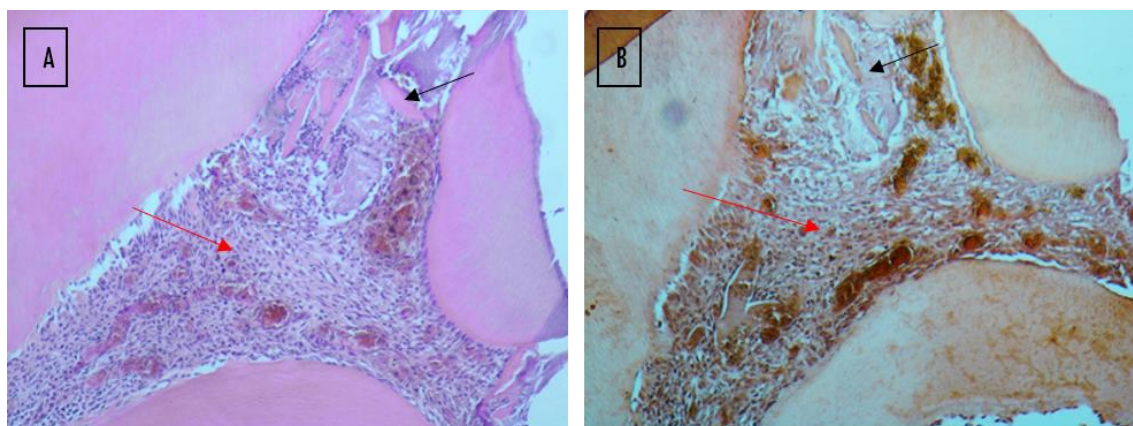


Figura 37: Imagens de cortes histológicos do grupo 3, no qual foi realizada a terapêutica com WhiteProRoot® MTA, aos 7 dias de follow-up. A imagem A foi corada com H&E e obtida com a ampliação 100x. A imagem B foi corada com alizarin red S e obtida com a ampliação 100x. Seta Preta — zonas correspondentes a tecido mineralizado (sem presença de ponte dentinária completa); seta vermelha - presença de infiltrado inflamatório ligeiro e manutenção da morfologia tecidual.

Nas imagens da Figura 36 correspondentes ao grupo 4, coradas com H&E e com uma ampliação de 40x, no qual a terapêutica de proteção pulpar direta foi efetuada com o Biodentine™, observa-se a presença do biomaterial utilizado na extensa zona de exposição, com a presença de um moderado infiltrado inflamatório (grau 2) com a presença de células como os polimorfonucleares neutrófilos. Observa-se, também, uma total desorganização da morfologia do tecido pulpar, com a manutenção da monocamada de odontoblastos em áreas muito restritas (grau 2). As imagens de imunohistoquímica e com a coloração com o *alizarin red*

S, para além de corroborarem os achados descritos, mostram alterações da presença de DSP ou de depósitos de cálcio (grau 2) com um aumento em todo o tecido pulpar.

Na Figura 38 podem observar-se os achados já descritos com uma ampliação de 100x. Na Figura 38-A com a coloração H&E, pode observar-se o infiltrado inflamatório intenso na zona de exposição com a presença de tecido mineralizado. Na Figura 38-B observa-se a deposição moderada de tecido duro imediatamente abaixo da zona de exposição e uma deposição ligeira noutras zonas do tecido pulpar.

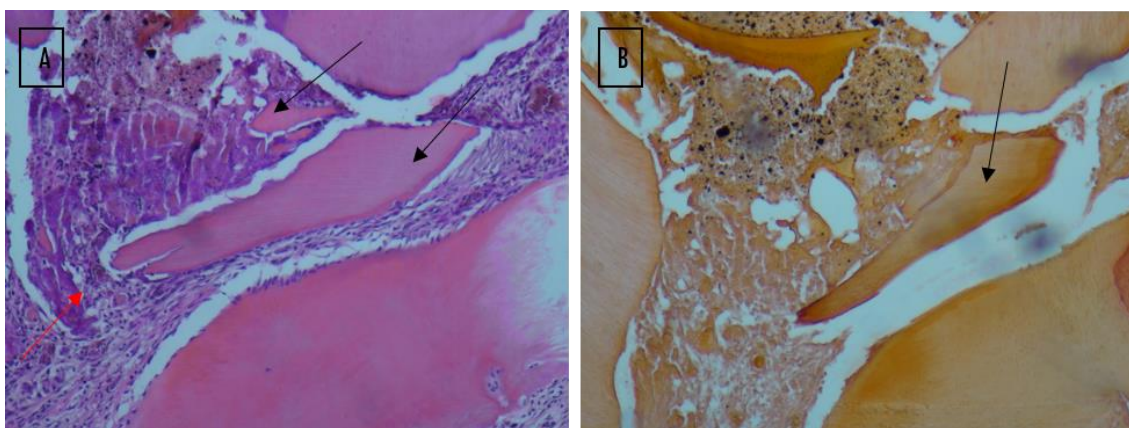


Figura 38: Imagens de cortes histológicos do grupo 4, no qual foi realizada a terapêutica com Biodentine™, aos 7 dias de *follow-up*. A imagem A foi corada com H&E e obtida com a ampliação 100x. A imagem B foi corada com *Alizarin Red S* e obtida com a ampliação 100x. Seta preta — presença de tecido mineralizado; seta vermelha - infiltrado inflamatório intenso na zona de exposição.

A Figura 39 representa os cortes histológicos de todos os grupos controlos, negativo e positivo, e dos grupos testes, nos quais se efetuou a terapêutica com WhiteProRoot®MTA ou Biodentine™, após 21 dias de *follow-up*.

Nas imagens da Figura 39 correspondentes ao grupo controlo negativo, com uma ampliação de 40x, é possível observar arquitetura geral anatómica de um molar de rato com a zona coronária e radicular, semelhante ao observado no *follow-up* dos 3 e 7 dias.

Nas imagens da Figura 39 correspondentes ao grupo controlo positivo, com uma ampliação de 40x, é possível observar a arquitetura geral do molar com zona de exposição pulpar no centro da coroa dentária. Tal como no *follow-up* dos 3 e 7 dias, observa-se um intenso infiltrado

inflamatório (grau 3) e uma total desorganização do tecido (grau 3). Não é visível qualquer formação de tecido mineralizado, quer seja dentro do tecido pulpar ou adjacente à zona de exposição (grau 0). Estes achados histológicos são corroborados pela observação da Figura 40-A.

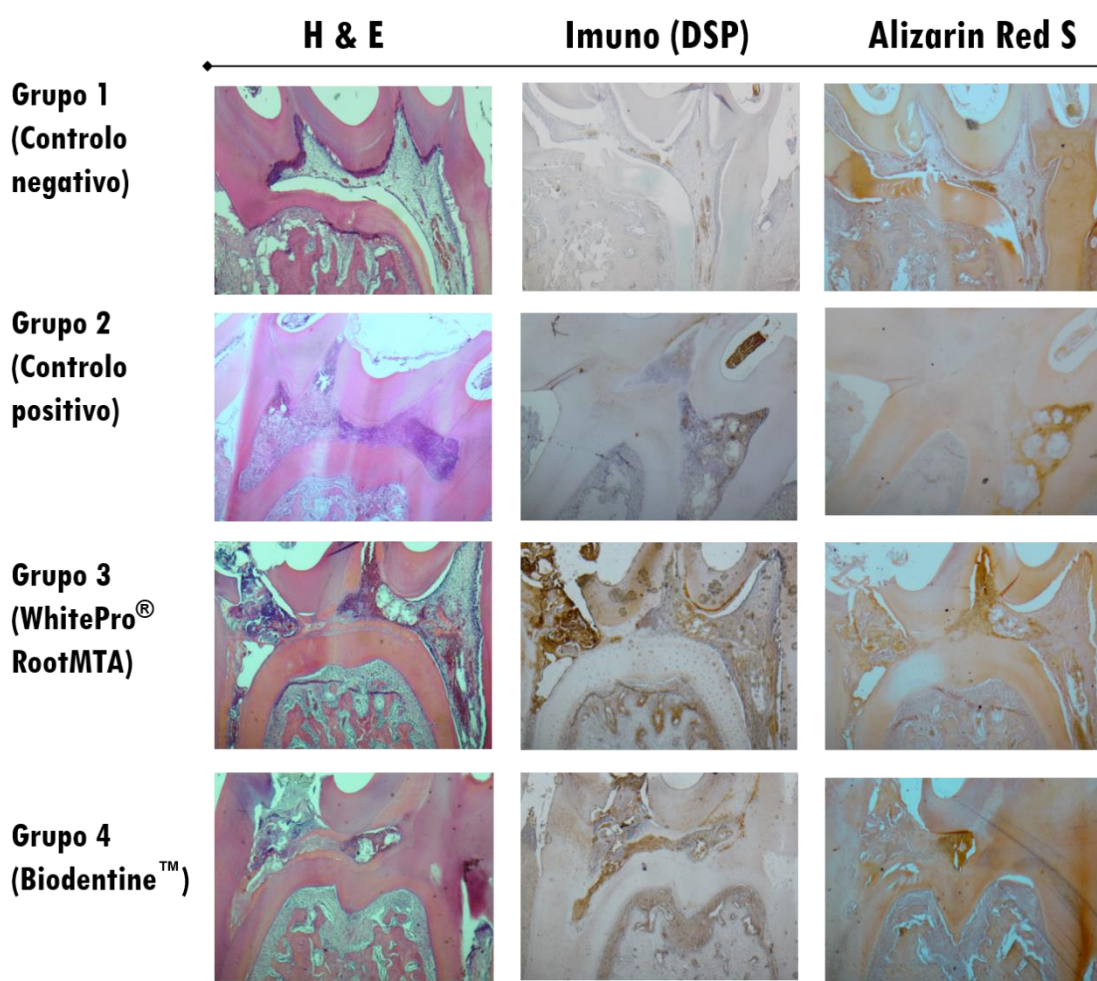


Figura 39: Imagens de cortes histológicos de todos os grupos de estudo aos 21 dias de follow-up, corados com hematoxilina e eosina (H&E) (coluna esquerda), por imunohistoquímica para a DSP (coluna central) e com alizarin red S (coluna direita). Todas as imagens foram obtidas com uma ampliação 40x.

Nas imagens da Figura 39 correspondentes ao grupo 3, em que se efetuaram terapêuticas de proteção pulpar direta com WhiteProRoot[®]MTA, com uma ampliação de 40x, coradas com H&E

é possível observar a presença de um infiltrado inflamatório intenso nas zonas perto da exposição (grau 2) e ligeiro a moderado nas restantes (grau 1). É, ainda possível, observar uma desorganização tecidual maior nas zonas perto da exposição (grau 2). Nas imagens processadas por imunohistoquímica e com o *alizarin red S* podem ser observadas zonas com maior presença de DSP e com maior deposição de tecido mineralizado junto à zona de exposição, imediatamente adjacente ao tecido dentinário, o que revela a edificação de uma ponte dentinária, ainda que incompleta (grau 2). Esta formação de tecido mineralizado é semelhante ao tecido dentinário, apenas sendo detetável pela diferença ligeira de coloração como se pode observar na Figura 40-B, com uma ampliação de 100x. Não se verifica a presença no tecido pulpar de outras zonas com depósitos de cálcio.

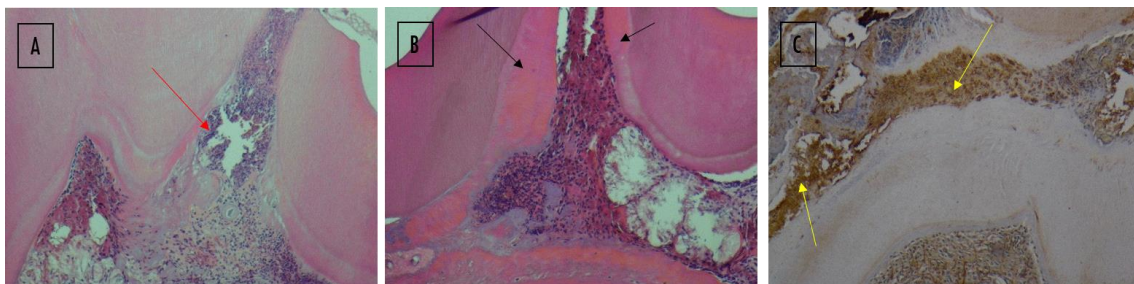


Figura 40: Imagens de cortes histológicos do grupo 2, 3 e 4 aos 21 dias de *follow-up*, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e por imunohistoquímica para a DSP. A imagem A correspondente ao grupo 2 (controlo positivo), foi corada com H&E e obtida com a ampliação 100x. Seta vermelha - intenso infiltrado inflamatório com total desorganização do tecido pulpar. A imagem B correspondente ao grupo 3 (terapêutica com WhiteProRoot[®] MTA) foi corada com H&E e obtida com a ampliação 100x. Seta preta - deposição de tecido mineralizado junto à zona de exposição, imediatamente adjacente ao tecido dentinário, revelando uma ponte dentinária incompleta. A imagem C correspondente ao grupo 4 (terapêutica com Biodentine[™]) foi corada por imunohistoquímica para a DSP e obtida com a ampliação 100x. Seta amarela — marcação intensa de DSP junto à zona da exposição pulpar.

Nas imagens da Figura 39 correspondentes ao grupo 4, em que se efetuou terapêuticas de proteção pulpar direta com o Biodentine[™], com uma ampliação de 40x, coradas com H&E é possível observar um infiltrado inflamatório intenso (grau 2) com uma total desorganização tecidual (grau 2), em especial perto da zona de exposição. A observação das imagens coradas por imunohistoquímica revelam um aumento da DSP especialmente junto à zona da exposição pulpar. Estes achados histológicos são corroborados pela observação da Figura 40-C, com uma

ampliação de 100x. A intensa formação de depósitos de cálcio pode ser observada junto à zona de exposição e em todo o tecido pulpar, com a presença de calcificações intrapulpares (grau 3).

Discussão

No nosso trabalho experimental optou-se pela realização de um estudo com terapêuticas em modelo animal, já que este tipo de testes pode ser utilizado para prever a biocompatibilidade de um determinado produto. Estes testes são tanto mais fidedignos quanto mais mimetizarem a utilização clínica dos produtos testados, incluindo o tempo, a localização, o meio e a técnica de aplicação.

A norma ISO 7405 determina a metodologia para a avaliação de biocompatibilidade pré-clínica de materiais ou dispositivos de utilização em Medicina Dentária (ISO, 2008). Esta norma determina, claramente, que apenas mamíferos não roedores como os macacos, porcos miniatura e cães, são as espécies adequadas para pesquisa animal em Medicina Dentária (ISO, 2008; Murray e Garcia-Godoy, 2007). No entanto, vários estudos de biocompatibilidade têm sido publicados nos últimos anos com utilização de dentes molares de ratos, com o objetivo de avaliar as reações teciduais após a exposição do tecido pulpar. Vários desses trabalhos demonstraram que a cicatrização do tecido da polpa dentária de um molar do rato, após a proteção pulpar, é histologicamente comparável com o que ocorre nos seres humanos e em outras espécies animais. Os dentes molares do rato, incluindo o tecido pulpar, podem ser considerados anatômica, histológica, biológica e fisiologicamente como dentes molares humanos em miniatura. Assim, as reações biológicas essenciais do tecido pulpar e as interações que ocorrem durante os diferentes estádios da cicatrização em dentes molares de ratos, são comparáveis às de outros mamíferos (Decup *et al.*, 2000; Goldberg *et al.*, 2001; Jaber, Mascrès e Donohue, 1991; Negm, Combe e Grant, 1981; Paterson, Radford e Watts, 1981; Watts e Paterson, 1981, 1983). Outros estudos referem que as taxas de sucesso de proteções pulpar diretas no modelo animal de rato, são semelhantes às taxas de sucesso de terapêuticas em

humanos, o que não se verifica em estudos com outros modelos animais, nomeadamente de cão e de porco (Dammaschke, 2010; Watts e Paterson, 1981). Outros autores referem que o modelo animal em macacos não é adequado para terapêuticas que envolvam o tecido pulpar, uma vez que o mecanismo de reparação dentinária é diferente do humano (Dammaschke, 2010). Além disso, alguns estudos referem que a flora bacteriana e os subprodutos subsequentes são semelhantes entre o rato e os humanos, o que não acontece com outros modelos animais, nomeadamente o cão (Stashenko *et al.*, 1994; Wunder, Briner e Calkins, 1976). Alguns autores referem que os dentes molares do rato são um modelo de estudo válido para fornecer dados sobre a reação tecidual da polpa após uma exposição pulpar, embora tenham uma capacidade de resiliência e de regeneração excecionais que devem ser tidas em consideração (Dammaschke, 2010). Assim, a utilização de ratos pode reduzir significativamente o número de animais usados atualmente em investigação, com vantagens éticas e económicas consideráveis. Os testes em animais de desenvolvimento superior devem ser limitados a desenhos experimentais que pretendam esclarecer resultados inconsistentes (Dammaschke, 2010). No entanto e apesar das semelhanças e das vantagens existem algumas dificuldades técnicas, como as pequenas dimensões dos dentes molares do rato, e a manipulação dos animais para realizar terapêuticas na cavidade oral, sendo recomendado um treino de manipulação prévio da equipa de investigação e a utilização de instrumental de microcirurgia (Dammaschke, 2010). No nosso estudo, a escolha do rato como modelo animal foi óbvia, dadas as vantagens éticas e económicas já referidas, a reprodutibilidade do modelo e a experiência da equipa de investigação com o mesmo.

A metodologia utilizada no nosso estudo em modelo animal é suportada por outros estudos existentes na literatura (Dammaschke *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016; Kuratate *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2017), nos quais são utilizados os primeiros molares de rato para efetuar as exposições pulpares que, após as manobras de desinfeção e de hemostasia, são seladas com biomateriais.

Tal como já referido por outros autores, também no presente estudo foi possível observar a semelhança, quer anatómica quer histológica, dos molares inferiores de rato relativamente aos molares humanos (Dammaschke *et al.*, 2010; Stanley, 1998). Foi possível observar a estrutura dentinária que rodeia todo o tecido pulpar, com a visualização dos túbulos dentinários

semelhantes ao humano. No tecido pulpar podem ser observadas várias populações celulares, nomeadamente fibroblastos, células sanguíneas, células nervosas, células indiferenciadas e odontoblastos dispostos na periferia de todo o tecido pulpar. Em termos anatómicos, o primeiro molar do rato é semelhante aos molares inferiores humanos, quer no que toca à estrutura coronária, com três cúspides, quer na estrutura radicular, com duas raízes mesial e distal. Estas características foram observadas através do grupo controlo negativo.

O grupo controlo positivo foi também, importante no presente estudo, por permitir testar a validade do nosso modelo experimental. De facto, foi observado que após a exposição do tecido pulpar do rato ao ambiente externo da cavidade oral, inicia-se um processo inflamatório severo com infiltrado inflamatório intenso e uma total desorganização da morfologia celular, compatível com um tecido em necrose. Estas alterações são visíveis em todos os tempos de *follow-up*, mantendo-se sempre com características semelhantes ao longo desses tempos. Assim, é possível afirmar que o não tratamento desta situação clínica, desenvolve um processo biológico que culmina na necrose do tecido pulpar.

As terapêuticas efetuadas com os dois biomateriais, o WhiteProRoot®MTA considerado o material *gold standard* para proteções pulpares diretas e o Biodentine™, um cimento de silicato tricálcico desenvolvido para melhorar algumas das características dos cimentos de MTA, demonstraram ter efeitos indutores de um processo reparador no tecido pulpar exposto. No grupo 3 onde foram efetuadas terapêuticas com o WhiteProRoot®MTA, observou-se o aparecimento de um infiltrado inflamatório intenso após três dias de *follow-up*, com a desorganização da morfologia do tecido pulpar. No entanto, estas características inflamatórias estiveram presentes, apenas numa fase inicial, tendo depois sido observado uma diminuição gradual da sua intensidade e uma reorganização do tecido pulpar após sete dias de *follow-up*. Além disso, observou-se também, a manutenção da monocamada periférica de odontoblastos em todo o tecido, exceto na zona de exposição. Após 21 dias de *follow-up* foi observada a formação de um tecido mineralizado junto à zona de exposição, com características morfológicas diferentes do tecido dentinário original. Esta formação de mineralizado não foi detetada noutras zonas do tecido pulpar, o que indica a indução muito localizada da reparação da lesão através da formação de uma ponte dentinária. No grupo 4, onde foram efetuadas terapêuticas com o

Biodentine™, observaram-se algumas características diferentes da terapêutica referida anteriormente. Após três dias de *follow-up* o infiltrado inflamatório observado era ligeiro, acompanhado de uma desorganização da morfologia pulpar apenas da camada periférica de odontoblastos na zona de exposição. Estes sinais inflamatórios foram aumentando de intensidade ao longo dos tempos de *follow-up*, acompanhados por um aumento da desorganização da morfologia celular, o que foi observado após sete e vinte-e-um dias. A formação de tecido mineralizado foi observada após sete dias de *follow-up*, com o aparecimento de algumas zonas mineralizadas junto à zona de exposição. Aos 21 dias, foram observadas diversas zonas mineralizadas junto à zona de exposição e em todo o tecido pulpar, designadas de calcificações pulpares generalizadas.

Assim, a análise histológica das terapêuticas realizadas com os dois biomateriais demonstrou que a reação inicial inflamatória é mais intensa o WhiteProRoot®MTA do que com o Biodentine™, sendo depois invertida com uma diminuição destes sinais no que se refere ao primeiro biomaterial e um aumento com o segundo. Estes sinais inflamatórios mais ou menos intensos são acompanhados proporcionalmente por uma desorganização da morfologia do tecido pulpar. Relativamente à formação de tecido mineralizado, ela não é observada após três dias de *follow-up* para nenhum dos biomateriais, uma vez que a indução da formação deste tipo de tecido depende da estimulação de vários processos complexos. Na terapêutica com o Biodentine™ esta formação inicia-se mais cedo, mas revela-se inespecífica e exagerada. Na terapêutica com o WhiteProRoot®MTA observa-se a formação de tecido mineralizado apenas após 21 dias de *follow-up*, e de forma organizada e localizada no local de exposição. Estes resultados são corroborados pelos obtidos através da técnica de imagem molecular por medicina nuclear. Após a administração de ^{99m}Tc-HMDP, este radiofármaco é captado e acumula-se no osso tendo em conta a sua elevada afinidade pelos cristais de hidroxiapatite parte integrante da matriz óssea. A matriz óssea é composta em 50% por matéria inorgânica onde se incluem íões como o fosfato, o cálcio, o magnésio, o sódio e o citrato. Destes componentes da matriz óssea, os íões de cálcio e de fosfato representam uma grande parte da componente inorgânica do osso formando os cristais de hidroxiapatite. Dessa forma, e tendo em conta os resultados obtidos em que se verifica um aumento da calcificação, ou seja, da acumulação de

cálcio não representará um aumento da captação do radiofármaco entre os grupos uma vez que para a sua retenção dentro da célula necessita da presença de fosfato.

Existem na literatura inúmeros estudos semelhantes ao nosso, que também tiveram por objetivo observar o que ocorre no tecido pulpar após o tratamento da exposição do mesmo ao ambiente externo. No entanto, verifica-se uma diversidade de metodologias e de modelos animais que tornam difícil a análise concreta dos resultados e a comparação entre si. Alguns autores referem que os cimentos à base de MTA induzem uma recuperação do tecido pulpar e a formação de dentina reparadora de forma superior aos cimentos à base de hidróxido de cálcio no modelo animal de cão, de macaco e de rato (Asgary *et al.*, 2008; Dammaschke *et al.*, 2010; Dominguez *et al.*, 2003; Faraco e Holland, 2001; Ford *et al.*, 1996). Noutro estudo, efetuado em modelo animal com porcos miniatura, foi observada a formação de tecido mineralizado sob a forma de ponte dentinária de modo semelhante com o WhiteProRoot®MTA e com o Biodentine™ (Shayegan *et al.*, 2012). Outros autores, concluem que a formação de tecido mineralizado com terapêuticas com Biodentine™ se traduz em pontes dentinárias com maior espessura e morfológicamente mais organizadas do que as terapêuticas que utilizem os cimentos à base de MTA (Rossi, De *et al.*, 2014; Tziafa *et al.*, 2014). Noutros estudos, foi demonstrada a formação de dentina reparadora em cavidades restauradas com Biodentine™ em modelos animais com porcos miniatura, com um aumento significativo da deposição quando comparados com cimentos à base de hidróxido de cálcio (Tziafa *et al.*, 2015).

Como já referido no estudo *in vitro*, a fosfatase alcalina e a sialoproteína da dentina são proteínas precursoras da formação de tecido mineralizado. No presente estudo foi avaliada por imunohistoquímica a presença de sialoproteína da dentina, observando-se um aumento da sua expressão após 21 dias de *follow-up* com ambos os biomateriais. Estes achados histológicos corroboram os que se obtiveram na coloração com o *alizarin red S*, demonstrando a sua relação direta com a formação de tecido mineralizado. Embora a intensidade da marcação de DSP constatada não tenha revelado diferenças entre os biomateriais estudados, a observação da formação de tecido mineralizado mostrou diferenças significativas, com uma maior incidência nas terapêuticas com o Biodentine™. Outros estudos concluíram que o Biodentine™ estimula os mesmos marcadores que o ProRoot®MTA, mas com uma marcação mais intensa de ALP nas zonas

das pontes dentinárias (Daltoé *et al.*, 2016). Outros autores observaram níveis de expressão de DSP mais elevados em tratamentos com o ProRoot®MTA do que com o Biodentine™. No entanto, a formação de uma ponte dentinária foi observada em tratamentos com ProRoot®MTA e com Biodentine™ de forma semelhante, embora com características diferentes na morfologia e espessura. Os autores referem que estas diferenças da qualidade da ponte dentinária podem ser explicadas pela maior desorganização da morfologia celular induzida pelo Biodentine™ (Kim *et al.*, 2016). Estas conclusões corroboram os resultados do nosso estudo *in vitro* que demonstraram uma maior biocompatibilidade do WhiteProRoot®MTA, com menor interferência na proliferação celular, na viabilidade celular, nos tipos de morte celular e no ciclo celular, quando comparado com o Biodentine™. Além disso, também no nosso estudo em modelo animal se pode observar uma maior desorganização da morfologia do tecido pulpar no tratamento com o Biodentine™.

Outros autores que avaliaram o desempenho dos dois biomateriais, o ProRoot®MTA e o Biodentine™, em tratamentos de perfuração de furca, concluíram que o primeiro biomaterial forma um tecido mineralizado de maior espessura (Silva *et al.*, 2017).

Outros materiais, como a matriz óssea desmineralizada têm, igualmente, sido testados nas terapêuticas de proteção pulpar direta em modelo animal de rato, com resultados promissores e superiores aos cimentos à base de hidróxido de cálcio, demonstrando a sua capacidade para promoverem a reparação através da formação de pontes dentinárias (Liu *et al.*, 2017).

A biocompatibilidade dos materiais dentários é fundamental para prevenir o aparecimento de reações inflamatórias e para permitir a regeneração tecidular. O método de implantação subcutânea é uma metodologia válida para determinar a biocompatibilidade dos materiais. Alguns autores, adotaram esta metodologia e corroboraram os resultados de outros estudos, demonstrando que o Biodentine™ exibe uma resposta inflamatória inicial, mas esta resposta é rapidamente seguida da formação de tecido conjuntivo, indicando a ausência de irritação tecidular (Mori *et al.*, 2014). Noutros estudos de compatibilidade subcutânea em ratos, os autores demonstraram que o número de células inflamatórias e de IL-6 foi significativamente superior com o Biodentine™, quando comparado com o MTA, após 7 e 15 dias de *follow-up*. No entanto, após 60 dias, observou-se uma regressão significativa da reação inflamatória e ambos

os materiais exibiam cápsulas com numerosos fibroblastos e fibras de colagénio (Silva *et al.*, 2017).

Embora em termos metodológicos ocorra uma grande disparidade entre os estudos como já referido, existe na generalidade um consenso relativo à indução da formação de tecido mineralizado com ambos os biomateriais ProRoot®MTA e Biodentine™. O desempenho superior relativamente aos cimentos à base de hidróxido de cálcio é, também, consensual. Relativamente à presença de uma reação inflamatória mais ou menos intensa ao longo dos tempos de *follow-up* dos vários estudos, existe alguma controvérsia. A reação inflamatória do tecido pulpar após tratamentos com o ProRoot®MTA é ligeira a moderada, como já discutido anteriormente na maioria dos estudos analisados. Em tratamentos com Biodentine™, alguns autores referem uma reação inflamatória inicial mais intensa com uma diminuição ao longo do tempo enquanto outros referem o contrário, como o verificado no nosso estudo em modelo animal. No entanto, em nenhum outro estudo é referido a formação exagerada de tecido mineralizado nos tratamentos com Biodentine™. Os achados histológicos relativos ao aumento exacerbado na formação de tecido mineralizado, nos tratamentos com este biomaterial observados no nosso estudo animal, são de extrema relevância para a sua posterior utilização clínica. Além disso, vêm na sequência das conclusões do estudo *in vitro*, no qual já se tinha verificado um aumento significativo na produção de fosfatase alcalina, de sialoproteína da dentina e na formação de depósitos de cálcio, nos tratamentos com o Biodentine™ quando comparados com o WhiteProRoot®MTA. Esta indução exacerbada de formação de tecido mineralizado pode dar origem à formação de calcificações da polpa em dentes humanos, como já observado no estudo animal, e dificultar clinicamente a utilização deste biomaterial.

PARTE III – ESTUDO CLÍNICO

CAPÍTULO VII — REVISÃO SISTEMÁTICA

As terapêuticas de proteção pulpar direta consistem na colocação de um biomaterial sobre a zona do tecido pulpar exposto, com o objetivo de induzir a reparação da zona exposta através da produção de uma barreira de tecido mineralizado. Para que este mecanismo fisiológico ocorra, antes da colocação do biomaterial, é fundamental conter a hemorragia provocada pela exposição do tecido pulpar e desinfetar a cavidade dentinária. Estes procedimentos são convencionalmente realizados com recurso a duas substâncias que podem ser utilizadas individualmente ou em simultâneo, a clorhexidina e o hipoclorito de sódio. No entanto, existem outras técnicas alternativas mais recentes e menos estudadas, como são exemplo a utilização de diversos tipos de *laser*. Assim, torna-se fundamental avaliar o desempenho dos diversos biomateriais com as técnicas convencionais e as técnicas alternativas.

Uma revisão sistemática é uma revisão de uma questão claramente formulada que utiliza métodos sistemáticos e explícitos para identificar, selecionar e avaliar criticamente uma investigação relevante assim como extrair e analisar dados dos estudos que estão incluídos na revisão. Já a meta-análise, refere-se à utilização de técnicas estatísticas numa revisão sistemática para integrar os resultados dos estudos incluídos, e obter conclusões a partir de dados quantitativos (Liberati, 2009). Tendo como base este tipo de ferramentas, fundamentais para a obtenção da evidência científica e, tendo como principal objetivo avaliar a evidência científica que existe atualmente em relação às terapêuticas de proteção pulpar direta, foi elaborado este capítulo.

Material e Métodos

A prática clínica baseada na evidência consiste na utilização da melhor evidência científica produzida, para suportar e consubstanciar a decisão clínica. No entanto, para se identificar a melhor evidência é absolutamente necessária uma adequada construção da pergunta de investigação e, concomitantemente, uma revisão robusta da literatura científica.

Para a construção da pergunta adequada, recorreu-se à utilização da estratégia *PICO*. *PICO* é o acrónimo para *Patient, Intervention, Comparison e Outcomes*. Estes quatro componentes são os elementos fundamentais da questão de investigação e possibilitam uma definição correta das informações (evidências) que são necessárias para a resolução da questão clínica, maximizam a recuperação de evidências nas bases de dados, otimizam as palavras chave e evitam a procura desnecessária nas bases de dados (Aslam e Emmanuel, 2010). A questão PICO foi formulada com base nos pressupostos referidos e está descrita na Tabela 6.

Tabela 6: Formulação da questão PICO.

P	<i>Patient, Population, or Problem</i>	Dentes permanentes com exposição da polpa dentária...
I	<i>Intervention, Prognostic Factor, or Exposure</i>	...Qual o biomaterial ou terapêutica de proteção pulpar direta...
C	<i>Comparison or Intervention (if appropriate)</i>	...mais eficaz...
O	<i>Outcome you would like to measure or achieve</i>	...para preservar a vitalidade do tecido pulpar...

Questão PICO: Dentes permanentes com exposição da polpa dentária: Qual o biomaterial ou terapêutica de proteção pulpar direta mais eficaz para preservar a vitalidade do tecido pulpar?

Esta revisão sistemática e meta-análise foram, também, realizadas tendo como base as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)* (Moher *et al.*, 2010).

Pesquisa Bibliográfica

Foram utilizadas várias bases de dados para realizar a pesquisa, nomeadamente a Pubmed, a Cochrane Trials, a Cochrane Economics, a Cochrane Reviews e a Embase. A pesquisa foi realizada desde 01/01/1980 até 31/08/2017, com os filtros *Humans* e *English Language*, utilizando a seguinte fórmula de pesquisa:

"Dental Pulp Capping"[MAJR] AND ("calcium silicate"[Supplementary Concept] OR "calcium silicate"[All Fields]) AND ("dental cementum"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cementum"[All Fields]) OR "dental cementum"[All Fields] OR "cement"[All Fields] OR "dental cements"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "cements"[All Fields]) OR "dental cements"[All Fields]) OR ("tricalcium silicate"[Supplementary Concept] OR "tricalcium silicate"[All Fields] OR "biodentine"[All Fields]) OR ("Dental Pulp Capping"[MAJR] AND (("mineral trioxide aggregate"[Supplementary Concept] OR "mineral trioxide aggregate"[All Fields]) OR mta[All Fields])) OR ("Dental Pulp Capping/methods"[MeSH Major Topic] AND ("1980/01/01"[PDAT]: "2017/12/31"[PDAT]) AND "humans"[MeSH Terms]) OR ("Dental Pulp Capping"[Title] AND ("1980/01/01"[PDAT]: "2017/12/31"[PDAT])) OR ("Dental Pulp Capping"[MeSH Major Topic] AND "Biocompatible Materials"[MeSH Terms] AND ("1980/01/01"[PDAT]: "2017/12/31"[PDAT]) AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]) AND (("1980/01/01"[PDAT]: "2017/12/31"[PDAT]) AND "humans"[MeSH Terms]) AND ("1980/01/01"[PDAT]: "2017/12/31"[PDAT]) AND "humans"[MeSH Terms] AND English[lang]).

A pesquisa foi realizada, por dois revisores independentes, para identificar artigos potencialmente relevantes. Foi efetuado um primeiro escrutínio pelo título e posteriormente pelo resumo. A lista final de artigos potencialmente relevantes foi escolhida após a leitura do texto completo pelos dois revisores principais. Um terceiro revisor foi consultado no caso de dúvidas de elegibilidade nesta fase e a decisão foi tomada por consenso.

Extração de dados

Em qualquer revisão sistemática é necessário estabelecer critérios de inclusão e de exclusão, de forma a balizar os critérios para que o escrutínio dos revisores seja rigoroso. Assim, os critérios de inclusão para a seleção e a extração de dados foram: (1) ensaios randomizado controlados, estudos prospetivos e retrospectivos e séries de casos; (2) ensaios em dentes permanentes; e (3) proteções pulpar diretas ou pulpotomias parciais até 4mm. Os critérios de exclusão foram (1) estudos *in vitro* ou *in vivo* com animais; (2) ensaios *in vivo* em dentes da dentição decídua; (3) pulpotomias totais; e (4) proteções pulpar indiretas. As cartas, comentários, editoriais, relato de casos, procedimentos, comunicações pessoais e estudos com insuficiente informação foram excluídos.

Os estudos que preenchiam os critérios de inclusão foram processados para a extração de dados. Os dados foram os seguintes: o nome do primeiro autor, o ano de publicação, o tipo de estudo, a idade dos doentes, o número de dentes em cada grupo, o tipo de dentes, os tempos de estudo, a intervenção (materiais e técnicas utilizadas) e os resultados clínicos (taxa de sucesso, resposta inflamatória, formação de ponte dentinária). A extração da informação foi efetuada por dois autores independentes utilizando um formulário estandardizado. Uma reunião de consenso foi sempre realizada para confirmar o acordo e para resolver o desacordo entre os revisores.

Para a meta-análise, em estudos com múltiplos grupos, apenas os dados do grupo controlo e dos grupos experimentais objeto de análise foram extraídos. A meta-análise foi efetuada através do *software Comprehensive Meta-Analysis version 3* (Software CMA, Biostat, Englewood, USA).

Avaliação da qualidade dos estudos

A avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos é essencial para a compreensão dos resultados da meta-análise. Esta qualidade de cada estudo RCT (do inglês *randomized controlled trials*) foi avaliada utilizando a ferramenta de avaliação de risco de enviesamento descrita no Manual Cochrane de Revisões Sistemáticas de Intervenções (Versão

5.1.0) (Carvalho, Silva e Grande, 2013). Foram avaliados seis domínios: (1) geração de sequência aleatória para escolha dos participantes (viés de seleção); (2) ocultação da alocação (viés de seleção); (3) intervenção cega de doentes e investigadores (viés de desempenho); (4) avaliação cega de resultados (viés de deteção); (5) dados de resultado incompletos (viés de atrito); (6) relatórios seletivos (viés de relatório); e (7) outros vieses.

A qualidade dos estudos de coorte foi avaliada de acordo com o índice metodológico para ensaios não aleatorizados (do inglês *Methodological Index for Non-Randomized Studies – MINORS*) (Slim *et al.*, 2003). Neste índice são avaliados os itens metodológicos de estudos não comparativos, nomeadamente: (1) objetivo claro indicado; (2) inclusão de doentes consecutivos; (3) colheita prospetiva de dados; (4) *endpoints* apropriados ao objetivo de estudo; (5) avaliação sem enviesamento dos *endpoints* de estudo; (6) período de *follow up* adequado ao objetivo de estudo; (7) perdas no *follow up* de menos de 5%; e (8) cálculo prospetivo do tamanho da amostra do estudo. Existem alguns critérios adicionais, que também foram avaliados, para estudos comparativos, nomeadamente: (9) grupo controlo adequado; (10) grupos contemporâneos; (11) equivalência de base dos grupos; e (12) adequada análise estatística. Os itens são classificados como não referido (pontuação 0); referido, mas inadequado (pontuação 1); e referido e adequado (pontuação 2). A classificação global ideal é de 16 para estudos comparativos, e de 24 para estudos não comparativos.

Análise estatística para a meta-análise

As diferentes categorias de estudo, nomeadamente a taxa de sucesso, a formação de ponte dentinária e a ausência de sinais inflamatórios, analisaram-se separadamente e em conjunto, uma vez que todas traduzem o sucesso da terapêutica. Foram utilizados *odds ratios* (ORs) e intervalos de confiança (ICs) de 95% para comparar os resultados das terapêuticas com cimentos à base de hidróxido de cálcio e com cimentos à base de MTA; das terapêuticas com cimentos à base de MTA e com cimentos à base de silicatos tricálcicos; e das terapêuticas com sistemas adesivos e com cimentos à base de hidróxido de cálcio. O teste padrão do qui-quadrado e a estatística I^2 foram utilizados para testar a heterogeneidade entre os estudos; $P < 1$ ou $I^2 > 50\%$ sugeriram a presença de heterogeneidade. Quando foi detetada heterogeneidade entre os

estudos utilizou-se um modelo de efeitos aleatórios. Quando não foi detetada, optou-se por um modelo de efeitos fixos. Todas as análises foram realizadas com o *Comprehensive Meta-Analysis version 3* (Software CMA, Biostat, Englewood, USA).

Avaliação do risco de enviesamento dos estudos

A avaliação do viés de publicação efetuou-se através da realização de gráficos de funil (do inglês *funnel-plots*) de forma qualitativa, utilizando o *Comprehensive Meta-Analysis version 3* (Software CMA, Biostat, Englewood, USA) (Sterne *et al.*, 2011; Sterne e Egger, 2001).

Resultados

Seleção dos estudos

O diagrama observado na Figura 41 (Moher *et al.*, 2010) demonstra a progressão da seleção dos estudos relevantes para a análise sistemática e para a meta-análise. Do total de 819 estudos identificados através da pesquisa nas bases de dados referidas, de mais 2 adicionados através de outras fontes e, após a remoção dos duplicados ficaram 504 estudos. Após efetuada a triagem por título foram obtidos 327 estudos. Os artigos triados para elegibilidade após a leitura do resumo foram um total de 150 estudos, sendo excluídos 177. A leitura do texto completo levou à exclusão de 104 registos quando submetidos ao escrutínio dos critérios de exclusão. Após a leitura integral do texto dos artigos foram incluídos 46 artigos para a revisão sistemática e 22 para a meta-análise.

Características dos estudos

Os 46 estudos clínicos incluídos na revisão sistemática revelaram objetos de estudo diversos, isto é, vários biomateriais, nomeadamente cimentos à base de hidróxido de cálcio,

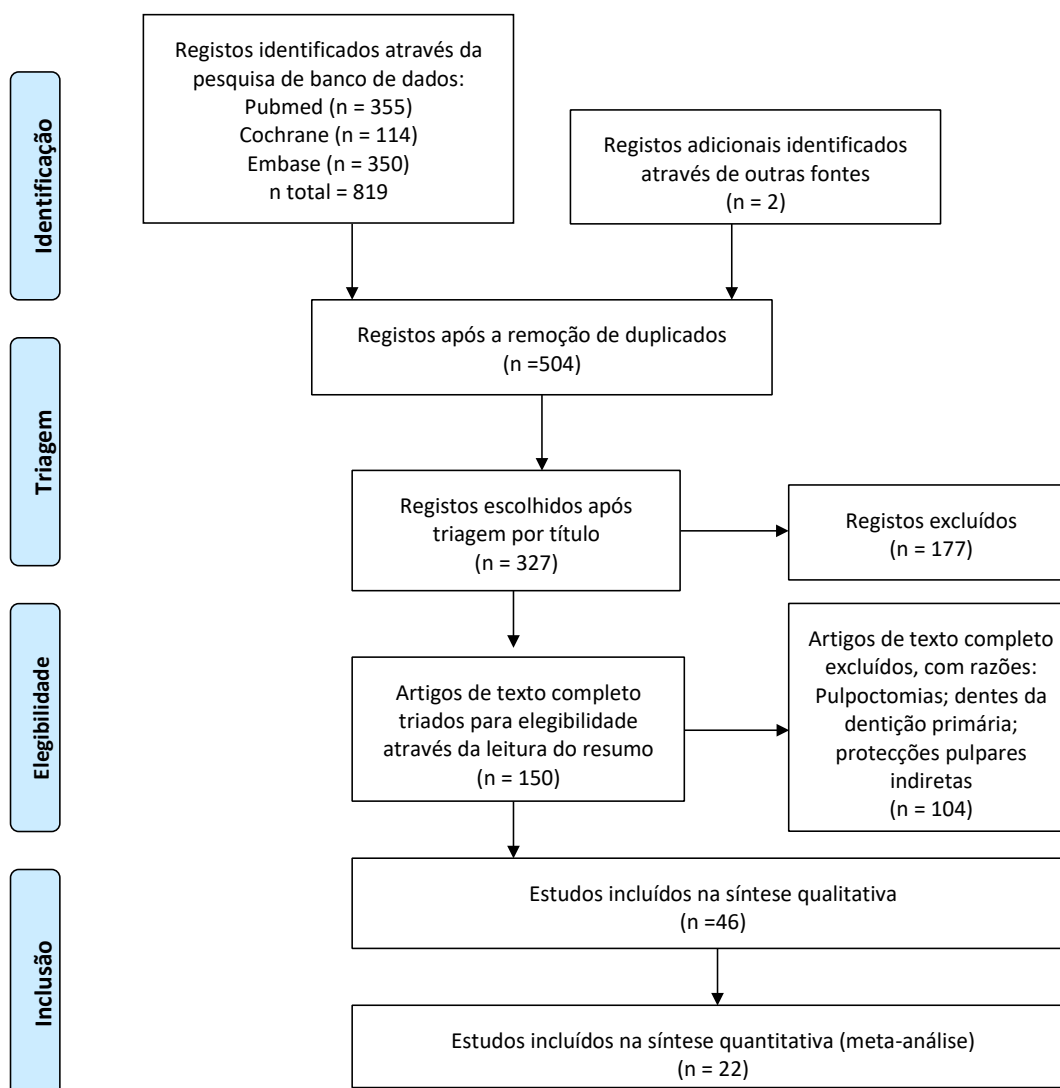


Figura 41: Diagrama de fluxo da seleção dos estudos para a revisão sistemática e a meta-análise (Moher *et al.*, 2010)

agregados trióxido minerais, silicatos tricálcicos, sistemas de adesão dentinária, proteínas morfogenéticas do esmalte, hidroxiapatite e outros fármacos; e ainda, outras técnicas de preparação cavitária não convencional, como a utilização de vários tipos de *laser*. Assim, foram incluídos 19 artigos que estudaram comparativamente os cimentos à base de hidróxido de cálcio e agregados trióxidos minerais, que podem ser observados na Tabela 7; e 5 artigos que estudaram os cimentos à base de agregados trióxidos minerais com os cimentos à base de silicato tricálcico, resumidos na Tabela 8. Para além destes foram, também, incluídos 10 artigos cujo objeto de estudo foram os sistemas de adesão dentinária utilizados como biomaterial em

proteções pulpar diretas e comparados com os cimentos à base de hidróxido de cálcio, e que podem ser analisados através da Tabela 9. Por último, foram também incluídos nesta revisão sistemática outros biomateriais com menor utilização neste tipo de terapêuticas como a hidroxiapatite, com 2 artigos; as proteínas morfogenéticas do esmalte, com 3 artigos; o polímero caprolactona, com 1 artigo; as formulações farmacêuticas magistrais de corticoides, antibióticos e antifúngicos, com 2 artigos; e outras técnicas não convencionais como o laser, com 4 artigos. Os resultados relativos a estes estudos estão descritos na Tabela 10.

Dos 19 artigos que comparam terapêuticas com cimentos à base de hidróxido de cálcio e cimentos à base de agregados trióxidos minerais, e que podem ser analisados na Tabela 7, 11 são ensaios clínicos controlados randomizados (do inglês *randomized controlled trials*— RCT) e 8 são estudos observacionais de coorte (do inglês *cohort study*— CS).

Nos estudos RCT selecionados observou-se que o número de dentes incluídos nas amostras de estudo varia entre 20 e 376 dentes, que o tipo de dentes escolhido foi o primeiro molar, o terceiro molar, o pré-molar ou vários, e que a idade dos doentes incluídos nos estudos varia entre os 6 e os 60 anos. Relativamente aos tempos de estudo, verificou-se uma variação entre os 8 dias e os 24 meses. Todos os estudos RCT incluíram grupos teste com cimentos à base de MTA e, em 9 deles, este biomaterial foi comparado com grupos controlo ou testes com cimentos à base de hidróxido de cálcio, em formulação farmacêutica de pó ou pasta. Em 9 estudos RCT foi avaliada a resposta inflamatória e/ou a formação de ponte dentinária. Apenas em três estudos foi avaliada a taxa de sucesso e, em três deles, os doentes foram monitorizados relativamente à sintomatologia, durante o tempo de estudo (Accorinte *et al.*, 2009; Hilton *et al.*, 2013; Iwamoto *et al.*, 2006; Min *et al.*, 2008; Qudeimat, Barrieshi-Nusair e Owais, 2007; Sawicki *et al.*, 2008). Assim, após a análise detalhada de todos os estudos RCT, foram estudados 769 dentes, dos quais 168 eram pré-molares, 161 eram terceiros molares, 64 eram primeiros molares e 376 outro tipo de dentes. Observando os resultados num tempo de estudo até aos 30 dias, para os grupos que utilizaram cimentos à base de hidróxido de cálcio, a resposta inflamatória intensa variou entre 30% e 80% (média de 55%) e a formação da ponte dentinária confirmou-se em

Tabela 7: Dados extraídos dos estudos selecionados na revisão sistemática e que utilizam como biomaterial de estudo, para as terapêuticas de proteção pulpar, os cimentos à base de hidróxido de cálcio e/ou os agregados trióxidos minerais

Autor/Ano (referência)	Tipo de estudo	Idade dos doentes	Grupos de estudo (n°)	Tempos de estudo	Materiais/Técnicas	Resultados Clínicos/Histológicos/Radiográficos		
						Taxa de sucesso	Resposta inflamatória	Formação de ponte dentinária
Accorinte <i>et al.</i> (Accorinte <i>et al.</i> , 2008)	RCT	15-30	40 (PM) Ta: 10 Tb: 10 Tc: 10 Td: 10	30 dias 60 dias	Ta: pó Ca(OH) ₂ + cimento Ca(OH) ₂ Life® (Kerr) + Cimento OZnE (IRM – Dentsply) – 30 dias Tb: pó Ca(OH) ₂ + cimento Ca(OH) ₂ Life® (Kerr) + Cimento OZnE (IRM – Dentsply) – 60 dias Tc: MTA(Angelus)+ Cimento OZnE (IRM – Dentsply) – 30 dias Td: MTA(Angelus)+ Cimento OZnE (IRM – Dentsply) – 60 dias	Sem avaliação	Ta: (<)7/10 70%; (>) 3/10 30% Tb: (<) 7/10 70%; (>) 3/10 30% Tc: (<) 8/10 80%; (>) 2/10 20% Td: (<) 7/10 70%; (>) 3/10 30%	Ta: (F+) 6/10 60%; (F+/-) 4/10 40% Tb: (F+) 8/10 80%; (F+/-) 2/10 20% Tc: (F+) 4/10 40%; (F+/-) 4/10 40%; (F-) 2/10 20% Td: (F+) 7/10 70%; (F+/-) 3/10 30% Ausência de microorganismos 60 dias: Ta: 100%; Tb: 100%
Aeinehchi <i>et al.</i> (Aeinehchi <i>et al.</i> , 2003)	RCT	20-25	22 (3° M) Apenas 14 final	8 dias -2det 60 dias -3 det 90 dias-5 det 120 dias-2det 180 dias-2det	Ta: Ca(OH) ₂ Dycal (Cauk) + cimento OZnE Tb: MTA ProRoot (Dentsply) + Cimento OZnE	Sem avaliação	8 dias Ta: (>) 100%; Tb: (>) 100% 60 dias Ta: (>) 100%; Tb: (<) 50% (>)50% 90 dias Ta: (>) 100%; Tb: (<) 66.6% (>) 33.3% 120 dias Ta: (>) 100%; Tb: (>) 0% 180 dias Ta: (>) 100%; Tb: (>) 0%	8 dias Ta: (F+)0%; Tb: (F+)0% 60 dias Ta: (F+)0%; Tb: (F+) 50% (F+/-) 50% 90 dias Ta: (F+/-) 100%; Tb: (F+) 100% 120 dias Ta: (F+/-)100%; Tb: (F+)100% 180 dias Ta: (F+/-)100%; Tb: (F+)100%
Min <i>et al.</i> (Min <i>et al.</i> , 2008)	RCT	21-50	20 (3°M) Ta: 9/10 Tb:10	60 dias	Ta: MTA ProRoot (Dentsply)+ CIV (Fuji, GC)+compósito (Contax+Luxacore) Tb: Ca(OH) ₂ Dycal (Dentsply) + CIV (Fuji)+compósito (Contax+Luxacore) C: sem exposição – controle negativo)	Dentes clinicamente assintomáticos em todos os tempos	Ta: (<) 2/9 22%; (>)7/9 77% Tb: (<) 1/10 10%; (>)8/10 80%; (>+) 1/10 10%	Ta: (F+) 9/9 100% Tb: (F+) 6/10 60%; (F-)4/10 40%

Accorinte <i>et al.</i> (Accorinte <i>et al.</i> , 2008)	RCT	15-30	40 (PM) Ta: 10+10 Tb: 10+10	30 dias 60 dias	Ta: Ca(OH) ₂ Life (Kerr) + CIV (Vitrebond)+compósito (Scotchbond M + Z100 -3M Tb: MTA ProRoot (Dentsply)+ CIV (Vitrebond)+compósito (Scotchbond M + Z100 -3M	Sem avaliação	30 dias Ta: (<)10%; (>)60%; (>+)30% Tb: (<)30%; (>)50%; (>+)20% 60 dias Ta: (<)10%; (>)60%; (>+)30% Tb: (<)20%; (>)60%; (>+)20%	30 dias Ta: (F+)20%; (F+/-)40%; (F-)20% Tb: (F+)30%; F(+/-)70%; 60 dias Ta: (F+)60%; F(+/-)30%; (F-)10% Tb: (F+)50%; F(+/-)40%; (F-)10% Ausência de microorganismos: Ta: 90% Tb: 100%
Sawicki <i>et al.</i> (Sawicki <i>et al.</i> , 2008)	RCT	10-18	48 (PM) Ta: 32 C: 16	47-64 dias 65-180 dias 181-365 dias (De acordo com o timing do tratamento ortodôntico)	Ta: WMTA ProRoot (Dentsply)+ Tetric Flow+compósito (Syntac+Tetric Ceram – Ivoclar) C: Ca(OH) ₂ Life (Kerr) + Tetric Flow+compósito (Syntac+Tetric Ceram – Ivoclar)	Sem avaliação (sintomatologia dolorosa pós- operatória transitória em 2 dentes)	Ta: (<) 24/30 80%; (>)5/30 16.7%; (>+)1/30 3.3% C: (<)10/14 71.4%; (>)2/14 14.3%; (>+)2/1 7.1%	Ta: (F+)28/30 93.34%; (F+/-)1/30 3.33%; (F-)1/30 3.33% C: (F+)11/14 78.57%; (F+/-)1/14 7.15%; (F-)2/14 14.28%
Shaharavan <i>et al.</i> (Shahravan <i>et al.</i> , 2011)	RCT	20-24	36 (3 ^o M)	30 dias (29det) Ta: 10 Tb: 9 Tc: 10	Ta: MTA ProRoot (Dentsply) 0.28 powder/water ratio + CIV ((Fuji, GC) Tb: MTA ProRoot (Dentsply) 0.33 p/w ratio+ CIV ((Fuji, GC) Tc: MTA ProRoot (Dentsply) 0.40 p/w ratio+ CIV ((Fuji, GC)	Sem avaliação	Ta: (<) 9/10 90%; (>)1/10 10%; Tb: (<)7/9 77.8%; (>)2/9 22.2% Tc: (<)7/10 70%; (>)2/10 30%	Ta: (F+54/10 40%; F(+/-)6/10 60% Tb: (F+)3/9 33.3%; F(+/-)5/9 55.6%; (F-)1/9 11.1% Tc: (F+)4/10 40%; F(+/-)5/10 50%; (F-)1/10 10%
Accorinte <i>et al.</i> (Accorinte <i>et al.</i> , 2009)	RCT	25-42	40 (PM) Ta: 10 Tb: 10 Tc: 10 Td: 10	30 dias 60 dias	Ta: MTA cinzento (Angelus) + cimento OZnE (IRM – Dentsply) Tb: MTA cinzento (ProRoot – Dentsply) + cimento OZnE (IRM – Dentsply)	Dentes clinicamente assintomáticos em todos os tempos	30 dias Ta: (<) 3/8 37%; (>)5/8 63% Tb: (<)2/8 25%; (>)6/8 75% 60 dias Ta: (<) 7/10 70%; (>)3/10 30% Tb: (<)3/9 33%; (>)5/9 56%; (>+)1/9 11%	30 dias Ta: (F+)5/8 63%; F(+/-)2/8 25%; (F-) 1/8 12% Tb: (F+)5/8 63%; F(+/-)2/8 25%; (F-) 1/8 12% 60 dias Ta: (F+)6/10 60%; F(+/-)4/10 40% Tb: (F+)5/9 56%; F(+/-)3/9 33%; (F-)1/9 11%

Nair <i>et al.</i> (Nair <i>et al.</i> , 2008)	RCT	18-30	35(3°M) Ta: 20 Tb: 13	8 dias 30 dias 90 dias	Ta: WhiteMTA (ProRoot – Dentsply)+ cimento de OZnE (IRM- Dentsply) Tb: Ca(OH) ₂ Dycal (Dentsply) + cimento de OZnE (IRM- Dentsply)	Sem avaliação	8 dias Ta: (<)5/6 83%; (>) 1/6 17% Tb: (<)2/4 50%; (>)1/4 25%; (>+)1/4 25% 30 dias Ta:(<) 6/6 100% Tb: (<)1/5 20%; (>) 3/5 60%; (>+) 1/5 20% 90 dias Ta: (<)4/5 80%; (>)1/5 20% Tb: (<)0/4 0%; (>) 2/4 50%; (>+)2/4 50%	8 dias Ta: (F+)0/6 0% Tb: (F+)0/4 0% 30 dias Ta: (F+)3/6 50%; (F+/-)3/6 50% Tb: (F+)1/5 20%; (F+/-)3/5 60%; (F-) 1/5 20% 90 dias Ta: (F+)4/5 80%; (F+/-)1/5 20% Tb: (F+)0/4 0%; (F+/-)2/4 50%; (F-) 2/4 50%
Iwamoto <i>et al.</i> (Iwamoto <i>et al.</i> , 2006)	RCT	18-60	48 (3°M) Ta: 24 Tb:24	7 e 30 dias – só avaliação clínica 140 dias Ta: 23 Tb: 22	Ta: WhiteMTA (ProRoot – Dentsply)+Dyract Flow + compósito (Prime& BondNT+TPH resin – Dentsply) Tb: Ca(OH) ₂ Dycal (Dentsply) + Dyract Flow + compósito (Prime& BondNT+TPH resin – Dentsply)	7 dias Ta: (S-)15/24 62.5%; (S+/-) 9/24 37.5%; (S+) 0/24 0% Tb: (S-)17/24 70.83%; (S+/-) 6/24 25%; (S+) 1/24 4.17% 30 dias Ta: (T+)23/23 100% Tb: (T+)23/24 96%; (T-)1/24 4%	140 dias Ta: (<)18/22 82%; (>)3/22 14%; (>+)1/22 4% Tb: (<)18/23 78%; (>)0/23 0%; (>+)5/23 22%	140 dias Ta: (F+)20/22 90%; (F-) 2/22 10% Tb: (F+)18/23 78%; (F-) 5/23 22%
Marques <i>et al.</i> (Marques, Wesselink e Shemesh, 2015)	CS	Média 36.1±15	64 (Vários) (77.9% recall)	Média reavaliação 3.6 anos ±1.1	Ta: WhiteMTA (ProRoot – Dentsply) + cimento OZnE (Coltosol – Coltène) 4-12 semanas - +Adesivo (Optibond Solo – Kerr) + Compósito (Tetric EvoCeram – Ivoclar)	T(+) 91.3% Cáries oclusais: (T+)100% Cáries proximais: (T+) 89.7% Cáries iniciais: (T+)94.7% Cáries secundárias: (T+)88.9% Doentes <40: (T+)100% Doentes >40: (T+)80%	Sem avaliação	Sem avaliação
Farsi <i>et al.</i> (Farsi <i>et al.</i> <i>et al.</i> , 2006)	CS	9-12	30 (1°M)	6 meses 12 meses 18 meses 24 meses	Ta: WhiteMTA (ProRoot – Dentsply) + cimento OZnE (Coltosol – Coltène) 2 semanas - +Adesivo + Compósito	6 meses: (T+)26/30 86%; (T-) 4/30 14% 12 meses: (T+)26/30 86%; (T-) 4/30 14% 18 meses: (T+) 28/30 93% 24 meses: (T+)28/30 93%	Sem avaliação	Sem avaliação

Qudeimat <i>et al.</i> (Qudeimat, Barrieshi-Nusair e Owais, 2007)	RCT	6.8-10.3	64(1°M) Ta: 32 Tb:32	3, 6, 12meses <i>Follow up</i> — média 34.8±4.4 meses (51 det)	Ta: pasta Ca(OH) ₂ + cimento Ca(OH) ₂ + CIV (Vitrebond – 3M) + CIV (GC) Tb: MTA (ProRoot – Dentsply) + CIV (Vitrebond – 3M) + CIV (GC) Restauração definitiva – amálgama ou coroa metálica	Ta: (T+)91% Tb: (T+)93%	Sem avaliação	Ta: (F+)12/23 55% Tb: (F+)18/28 64%
Bogen <i>et al.</i> (Bogen, Kim e Bakland, 2008)	CS	7-45	53 (Vários)	6 semanas 6 meses <i>Follow up</i> — média 3.94 anos (49 det – 92.5 <i>recall</i>)	Ta: MTA (ProRoot – Dentsply)+ Clearfill (Kuraray) Após 5-10 – restauração definitiva Clearfill Bond + Clearfill APX composite (Kuraray)	Ta: (T+)97.96%	Sem avaliação	Ta: (F+)40/49 82%
Mente <i>et al.</i> (Mente <i>et al.</i> , 2014)	CS	Sem informação	229 (Vários)	Média <i>Follow Up</i> — 42 meses (74% <i>Recall</i>)	Ta: MTA Tb: Ca(OH) ₂	Ta: (T+)137/170 80.5% Tb: (T+) 35/59 59% MTA vs Ca(OH) ₂ (Odds ratio=2.67;95%CI, 1.36-5.25; P=.001) Restauração definitiva >2 dias vs Restauração definitiva imediata – (-) prognóstico Ta e Tb (Odds ratio=3.18; 95% CI,1.61-6.3;p=.004)	Sem avaliação	Sem avaliação
Hilton <i>et al.</i> (Hilton <i>et al.</i> , 2013)	RCT	>7	35 dentistas (376 det-Vários) Ta: 181 det Tb: 195 det	1 mês 6 meses 24 meses	Ta: Ca(OH) ₂ (Life – Kerr) + CIV (Vitrebond – 3M) Tb: MTA (ProRoot – Dentsply) + CIV (Vitrebond – 3M)	Ta: (T-)31.5% Tb: (T-)19.7% Ca(OH) ₂ vs MTA (Hazard ratio 2.15(95%CI, 1.19-3.87)	Sem avaliação	Sem avaliação
Horsted <i>et al.</i> (Horsted <i>et al.</i> , 1985)	CS	10-79	510 (Vários)	1, 3, 6, 12 meses <i>Follow Up</i> — 5 anos	Ca(OH) ₂ Dycal (Dentsply) + cimento de OZnE Pulpdent (Pulpdent) + Cimento OZnE Pasta de Ca(OH) ₂ + cimento OZnE	(T+)82% Dentes jovens e molares – taxas de sucesso >	Sem avaliação	Sem avaliação

Mente <i>et al.</i> (Mente <i>et al.</i> , 2010)	CS	8-78	167 (Vários) Ta:62 Tb:46	12-80 meses (122 det – 72.5% <i>recall</i>)	Ta: MTA Tb: Ca(OH) ₂	Ta: (T+)54/69 det 78%; (T-) 15/69 det 22% Tb: (T+)32/53 det 60%; (T-) 21/53 det 40% Restauração definitiva >2 dias vs Restauração definitiva imediata – (-) prognóstico Ta e Tb (Odds ratio=0.24; 95% CI, 0.09-0.66; p=.01)	Sem avaliação	Sem avaliação
Miles <i>et al.</i> (Miles <i>et al.</i> , 2010)	CS	21-85	75 (Vários)	12-27 meses (<i>recall</i> 51det.)	MTA + CIV (Vitrebond - 3M) + Amálgama/Resina composta/ CIV	(T-) 20/51 39% (T+)31/51 61% (S-) 23/31 74% (S+/-) 7/31 22% (S+)1/31 4% A idade do doente, o tamanho da exposição e a intensidade de hemorragia – não têm efeito na taxa de sucesso	Sem avaliação	Sem avaliação
Dammaschke <i>et al.</i> (Dammaschke, Leidinger e Schäfer, 2010)	CS	16-75	1853 (Vários) (<i>recall</i> 248)	Média 6.1±4.4 anos (<i>recall</i> 13.4% -	Pasta Ca(OH) ₂ (Calxyl) + cimento de OZnE (Hoffmann) ou CIV (Ketac Bond- 3M) + Amálgama, resina composta ou CIV (Ketac Fil – 3M)	(T-) 199/248 80.2% (T+)49/248 19.8% O fator idade – tem efeito na taxa de sucesso A restauração com CIV – (-) prognóstico em relação a outros tipos de restauração	Sem avaliação	Sem avaliação

RCT: *Randomized Controlled Trials*; CS: *Cohort Study*; T: grupo teste; C: grupo controle; PM – dentes pré-molares; 3° M – dentes terceiros molares; det – dentes; Tep. – tempo de estudo; (+) positivo; (-) negativo; (S-) sensibilidade pós-operatória negativa; (S+/-) sensibilidade pós-operatória moderada; (S+) sensibilidade pós-operatória severa; (T+) Taxa de sucesso positiva; (T-) Taxa de sucesso negativa; (<) sem resposta inflamatória ou com resposta ligeira; (>) com resposta inflamatória intensa; (>+) com resposta inflamatória muito intensa; (F+) formação de ponte dentinária; (F+/-) formação de algum tecido duro na zona de exposição; (F-) sem formação de tecido duro na zona de exposição.

20%; para os grupos que utilizaram cimentos à base de agregados trióxidos minerais a resposta inflamatória intensa variou entre 0% e 75% (média de 36%) e a formação de ponte dentinária variou entre 30% e 63% (média de 45%).

Em dois dos estudos foram realizadas avaliações aos 8 dias, verificando-se que não se formava qualquer ponte dentinária para ambos os biomateriais (Aeinehchi *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2008). Na observação dos resultados nos limites temporais máximos dos diversos estudos, que podem traduzir-se desde os 60 dias aos 365 dias, verificou-se que nos grupos que utilizaram cimentos à base de hidróxido de cálcio, a resposta inflamatória intensa variou entre os 22% e os 100% (média de 53%) e a formação da ponte dentinária variou entre os 0% e os 80% (média de 52%); e para os grupos que utilizaram cimentos à base de agregados trióxidos minerais a resposta inflamatória intensa variou entre os 0% e os 80% (média de 32%) e a formação de ponte dentinária variou entre os 40% e os 100% (média de 73%). Apenas em dois estudos foi avaliada a presença de microorganismos, tendo sido observada uma ausência destes em 95% dos dentes tratados com o hidróxido de cálcio e em 100% dos dentes tratados com MTA (Accorinte *et al.*, 2008, 2008). Nos três estudos RCT que avaliaram a taxa de sucesso verificou-se que esta variou de 93% a 100% (média de 96,3%) para dentes tratados com MTA e de 91% a 96% (média de 93,5%) para dentes tratados com hidróxido de cálcio, em *follow-up* de 30 dias (Iwamoto *et al.*, 2006), de 24 meses (Hilton *et al.*, 2013) e de 35 meses (Qudeimat, Barrieshi-Nusair e Owais, 2007).

Nos 8 estudos de coorte selecionados, observou-se que o número de dentes incluídos nas amostras de estudo variou entre 30 e 1853 dentes; que os dentes escolhidos foram diversos, desde estudos que selecionavam os primeiros molares como outros que incluíam todo o tipo de dentes; e que as idades dos doentes incluídos nos estudos variaram entre os 7 a os 85 anos. Relativamente aos tempos de estudo, verificou-se uma variação entre os 6 e os 144 meses, com taxas de resposta entre 68% a 92%, nos estudos que as referem. Apenas exceção para uma taxa de resposta muito mais baixa, de cerca de 14%, observada num estudo com uma amostra consideravelmente maior relativamente aos outros (Dammachke, Leidinger e Schäfer, 2010). A maioria dos estudos avaliou, apenas, o *follow-up* de um biomaterial, sendo que dois estudaram o hidróxido de cálcio e outros quatro o MTA. Em três estudos verificou-se que a avaliação incluía

os dois tipos de biomateriais. Outra característica destes estudos foi a de avaliarem a taxa de sucesso e não a resposta inflamatória e a formação de ponte dentinária, com exceção de um que avaliou a formação da ponte dentinária a partir de radiografias periapicais (Bogen, Kim e Bakland, 2008). Assim, com a observação dos dados extraídos dos estudos CS verificou-se que a taxa de sucesso para dentes tratados com MTA variou entre 61% e 97%, com uma média de 83%; enquanto que para dentes tratados com hidróxido de cálcio esta taxa variou entre 19% e 91%, com uma média de 62%. Alguns estudos concluíram ainda que o tipo de cavidade restaurada influencia o prognóstico de uma terapêutica de proteção pulpar, assim como, a idade do doente e o tipo e material da restauração definitiva. Alguns autores concluíram que as cavidades oclusais a partir de cáries primárias e doentes com menos de 40 anos são premissas que levam a um melhor prognóstico (Marques, Wesselink e Shemesh, 2015). Outros autores em dois estudos efetuados, concluíram que o prognóstico é melhor quando a restauração definitiva é efetuada de imediato após a terapêutica de proteção pulpar (Mente *et al.*, 2010, 2014). Outros autores corroboram algumas destas conclusões (Dammaschke, Leidinger e Schäfer, 2010). No entanto, outros autores concluíram que a idade do doente, o tamanho da exposição e a intensidade da hemorragia são fatores que não influenciam a taxa de sucesso (Miles *et al.*, 2010).

Os 5 artigos que comparam terapêuticas com cimentos à base de silicatos de cálcio com outros biomateriais, nomeadamente os cimentos à base de hidróxido de cálcio e de agregados trióxidos minerais, e que podem ser analisados na Tabela 8, são todos ensaios clínicos controlados aleatorizados (do inglês *randomized controlled trials* – RCT).

Nos estudos selecionados observou-se que o número de dentes incluídos nas amostras de estudo variou entre 28 e 46 dentes; que o tipo de dentes escolhido foi o terceiro molar, ou o pré-molar ou diversos; e que a idade dos doentes incluídos nos estudos variou entre os 15 e os 79 anos.

Tabela 8: Dados extraídos dos estudos selecionados na revisão sistemática e que utilizam como biomaterial de estudo, para as terapêuticas de proteção pulpar, os silicatos tricálcio e/ou os agregados trióxidos minerais.

Autor/Ano (referência)	Tipo de estudo	Idade dos doentes	Grupos de estudo (n°)	Tempos de estudo (dias)	Materiais/Técnicas	Resultados Clínicos/Histológicos/Radiográficos		
						Taxa de sucesso	Resposta inflamatória	Formação de ponte dentinária
Song <i>et al.</i> /2015 (Song <i>et al.</i> , 2015)	RCT	19-79 (Média 43)	46 (Vários) Ta (Inicial-23; Final – 22) Tb (Inicial - 23; Final- 21)	7; 15; 30; 90 (32 det) Taxa de resposta – 91.4%	Ta: ProRootMTA + bola de algodão úmida (2 dias) e IRM+ GC Fugii II Tb: Endocem + GC Fugii II	Ta: 95.5% (21/22 dentes) Tb: 90.5% (19/21 dentes)	Sem avaliação	Sem avaliação
Jang <i>et al.</i> /2015 (Jang <i>et al.</i> , 2015)	RCT	19-79 (Média 42)	46 (Vários) Ta (inicial e final – 23) Tb (Inicial 23; Final – 18)	7; 15; 30; 90; 180; 360 (41 det) Taxa de resposta – 89.13%	Ta: ProRootMTA + bola de algodão úmida (2 dias) e IRM+ GC Fugii II Tb: Endocem + GC Fugii II	Ta+Tb – 93.02% (90 dias-40/43 dentes) Ta+Tb – 85.37% (360 dias – 35/41 dentes) Ta: 86.96% (20/23 dentes) Tb: 83.33% (15/18 dentes) Tipo de cavidade influencia o prognóstico – (-) Classes V	Sem avaliação	Sem avaliação
Nowicka <i>et al.</i> /2013 (Nowicka <i>et al.</i> , 2013)	RCT	19-28	28 (3 ^o M) Ta – 11 Tb – 11 C – 6	7 – Avaliação de restaurações definitivas 45 (28 det) Taxa de resposta – 100%	Ta – Biodentine (Septodont) Tb – ProRootMTA (Dentsply)+ Ketac Molar (3M) C – Sem intervenção	Teste elétrico = (+) 28 (28) Teste térmico Cloreto de etilo = (+) 28(28) RX periapical = (-) patologia periapical 28(28)	Tep. 45 dias: Ta: (<) 91% (10/11 dentes) Tb: (<) 91% (10/11 dentes)	Tep. 45 dias: Ta: (F+) 63.7%; (F+/-) 36.3% Tb: (F+) 63.7%; (F+/-) 36.3%
Nowicka <i>et al.</i> /2015 (Nowicka <i>et al.</i> , 2015)	RCT	19-32	44 (3 ^o M) Ta – 11 Tb – 11 Tc - 11 Td – 11	7 – Avaliação de restaurações definitivas (grupo b e c) 45 (44 det) Taxa de resposta – 100%	Ta: Ca(OH) ₂ – Calcipast (Cerkamed) + Life(Kerr) + Single Bond Universal (3M)+Filtek (3M) Tb: MTA –WhiteProRootMTA (Dentsply) + bola de algodão úmida + Ketac Molar(3M) Tc – Biodentine (Septodont) Td: Adesivo – Single Bond Universal (3M)+Filtek (3M)	Teste elétrico = (+) 44 (44) RX periapical = (-) patologia periapical 44(44)	Sem avaliação	Tep. 45 dias: Ta: (F-) 36.4% (4/11); (F+/-) 54.5% (6/11); (F+) 9.1% (1/11) Tb: (F-) 27.3%(3/11); (F+/-) 54.6% (6/11); (F+) 18.2% (2/11) Tc: (F-) 27.3%(3/11); (F+/-) 45.5% (5/11); (F+) 27.3% (3/11) Td: (F-) 81.8%(9/11); (F+/-) 18.2% (2/11)

Zarrabi <i>et al.</i> (Zarrabi <i>et al.</i> , 2010)	RCT	15-25	32 (PM)	15 dias 60 dias	Ta: cimento à base cálcio+CIV (Fuji, CG)+ compósito (Heliomolar-Ivoclar) Tb: MTA (Angelus)+CIV (Fuji, CG)+ compósito (Heliomolar-Ivoclar)	Sem avaliação	15 dias: Ta: (<)50%; (>)37.5%; (>+)12.5% Tb: (<)12.5%; (>)62.5%; (>+)25% 60 dias Ta: (<)87.5%; (>)12.5%; (>+)0% Tb: (<)75%; (>)25%; (>+)0%	15 dias Ta: (F+)0%; F(+/-)37.5%; (F-)62.5% Tb: (F+)0%; F(+/-)62.5%; (F-)37.5% 60 dias Ta: (F+)50%; F(+/-)50% Tb: (F+)25%; F(+/-)75%
--	-----	-------	---------	--------------------	--	---------------	---	--

RCT: *Randomized Controlled Trials*; T: grupo teste; C: grupo controle; PM — dentes pré-molares; 3º M — dentes terceiros molares; det — dentes; Tep. — tempo de estudo; (+) positivo; (-) negativo; (T+) Taxa de sucesso positiva; (T-) Taxa de sucesso negativa; (<) sem resposta inflamatória ou com resposta ligeira; (>) com resposta inflamatória intensa; (F+) formação de ponte dentinária; (F+/-) formação de algum tecido duro na zona de exposição; (F-) sem formação de tecido duro na zona de exposição.

Relativamente há presença de resposta inflamatória intensa para dentes tratados com cimentos à base de silicatos tricálcico, verificou-se uma variação entre 9% e 12,5% (média de 11%), em comparação com uma variação de 9% e 25% (média de 17%) para dentes tratados com cimentos à base de MTA. No entanto, alguns autores verificaram que esta resposta inflamatória é mais intensa com ambos os biomateriais após 15 dias de *follow-up* (Zarrabi *et al.*, 2010). Relativamente à formação de ponte dentinária verificou-se a sua edificação completa em dentes tratados com cimentos à base de silicatos tricálcico com uma variação entre 27% e 63% (média de 47%), em comparação com uma variação de 18% e 63% (média de 36%) para dentes tratados com cimentos à base de MTA. Noutro estudo foram, ainda, submetidos a este parâmetro, dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio com formação de ponte dentinária em 9,1% dos dentes; e dentes tratados com sistemas de adesão dentinária onde se verificou a formação de ponte dentinária em 0% dos dentes (Nowicka *et al.*, 2015).

Os 10 artigos que comparam as terapêuticas com sistemas de adesão dentinária com outros biomateriais, nomeadamente os cimentos à base de hidróxido de cálcio, e que podem ser analisados na Tabela 9, são todos ensaios clínicos controlados aleatorizados (do inglês *randomized controlled trials*— RCT).

Tabela 9: Dados extraídos dos estudos selecionados na revisão sistemática e que utilizam como biomaterial de estudo, para as terapêuticas de proteção pulpar, os sistemas de adesão dentinária e/ou cimentos à base de hidróxido de cálcio

Autor/Ano (referência)	Tipo de estudo	Idade dos doentes	Grupos de estudo (n°)	Tempos de estudo (dias)	Materiais/Técnicas	Resultados Clínicos/Histológicos/Radiográficos		
						Taxa de sucesso	Resposta inflamatória	Formação de ponte dentinária
Hörsted-Bindslev <i>et al.</i> /2003 (Hörsted-Bindslev, Vilkinis e Sidlauskas, 2003)	RCT	11-21	34 (PM) T: 17 C: 17	7 dias (6 det), 10-15 dias (6 det), 56-71 dias (22det)	T: Ác. Ortofs 37%+Single Bond Adhesive System(3M) C: Dycal (Dentsply)+Vitrebond(3M)	Teste elétrico = (+) 33 (34)	Tep: 56-71 dias T: (<) 80% - 8(10) C: (<) 100% - 11(11)	Tep: 56-71 dias T: (F-) 80% - 8(10); (F+/-) 20% - 2(10) C: (F+) 45.5% - 5(11); (F+/-) 27.3% - 3(11)
Lu <i>et al.</i> /2008 (Lu <i>et al.</i> , 2008)	RCT	20-25	45 (3°M) T Adesivo: 21 T Ca(OH) ₂ : 20 C: 4 (s/ expo.)	7 dias (15 det) 30 dias (14 det) 90 dias (16 det)	T Adesivo: Clearfil SB (Kuraray) T Ca(OH) ₂ : Dycal (Dentsply) C: sem intervenção	Teste elétrico = T Adesivo=T Ca(OH) ₂ = C	Tep: 90 dias T Adesivo: (<) 100% - 7(7) T Ca(OH) ₂ : (<) 85.7% - 6(7)	Tep: 90 dias T Adesivo: (F+) 0% - 0(7) T Ca(OH) ₂ : (F+) 83.3% - 5(6)
Silva <i>et al.</i> /2006 (Silva <i>et al.</i> , 2006)	RCT	12-20	81 (1°PM) T Adesivo a:26 T Adesivo b: 26 T Ca(OH) ₂ :26 C: 3 (s/ expo.)	1 dia (5 det) 3 dias (5 det) 7 dias (8 det) 30 dias (8 det)	TAA: Ác. Ortofs 37%+ Single Bond Adhesive System(3M) TAB: Ác. Ortofs 10%+ Single Bond Adhesive System(3M) T Ca(OH) ₂ : Dycal (Dentsply)+Vitrebond(3M)	Dentes clinicamente assintomáticos em todos os grupos	Tep. 30 dias TAA: (<) 40% - 2(5) TAB: (<) 40% - 2(5) T Ca(OH) ₂ : (<) 80% - 4(5)	Tep. 30 dias TAA: (F+) 0% - 0(5) TAB: (F+) 0% - 0(5) T Ca(OH) ₂ : (F+) 100% - 5(5)
Fernandes <i>et al.</i> /2008 (Fernandes <i>et al.</i> , 2008)	RCT	Sem informação	46 (PM) T Adesivo: 20 T Ca(OH) ₂ :20 C: 6 (s/expo.)	7 dias (10 det) 30 dias (10 det)	T Adesivo: Ác. Ortofs 37%+Single Bond (3M) T Ca(OH) ₂ : pó de Ca(OH) ₂ (Biodinâmica)+Dycal (Densply)+Vitrebond(3M)	Tep. 7 dias: T Adesivo: Sem expressão de colagêneo tipo III e fibronectina T Ca(OH) ₂ : Camada difusa de colagênio tipo III e fibronectina (semelhante ao controlo) Tep. 30 dias: T Adesivo: Sem expressão de colagêneo tipo III e fibronectina T Ca(OH) ₂ : Camada uniforme de colagênio tipo III e fibronectina, com maior expressão camada pré-dentina		
Silva <i>et al.</i> /2013 (Silva <i>et al.</i> , 2013)	RCT	Sem informação	12 (PM) T Adesivo: 12	1 dia (6 det) 30 dias (6 det)	T Adesivo: Ác. Ortofs 37%+Single Bond (3M)	Dentes clinicamente assintomáticos em todos os tempos	Tep. 1 e 30 dias: T Adesivo: (>) 100% - 12(12)	Sem avaliação

Nowicka <i>et al.</i> /2016 (Nowicka <i>et al.</i> , 2016)	RCT	19-30	28 (3 ^o M) T Adesivo: 11 T Ca(OH) ₂ : 11 C: 6 (s/ expo.)	7 dias – controlo clínico 30 dias (28 det)	T Adesivo: Single Bond Universal (3M) T Ca(OH) ₂ : Calcpast (Cerkamed)+Life (Kerr)+Single Bond Universal (3M)	Teste elétrico=(+)28(28) Teste térmico Cloreto de etiló = (+) 28(28) Rx periapical=(-)patologia periapical 28(28)	Tep 30 dias: T Adesivo: (>) 80% T Ca(OH) ₂ : (<) 90%	Tep 30 dias: T Adesivo: (F-) 60%; (F+/-)40% T Ca(OH) ₂ : (F+) 63%; (F+/-) 37%
Rodrigues <i>et al.</i> / 2006 (Accorinte <i>et al.</i> , 2006)	RCT	15-25	40 (PM) T Adesivo: 20 C: 20	30 dias (10 det) 60 dias (10 det)	T Adesivo: Ác. Ortofs 37%+Adesivo multifrascos C: pó de Ca(OH) ₂ +Life (Kerr)	Tep. 30 dias: T Adesivo: 20% sintomáticos C: 20% sintomáticos Tep. 60 dias: T Adesivo: 20% sintomáticos C: 100% assintomáticos	Tep 30 dias: T Adesivo: (>) 80% C: (<) 100% Tep 60 dias: T Adesivo: (>) 90% C: (<) 100%	Tep 30 e 60 dias: T Adesivo: (F-) 100% C: (F+) 100%
Pereira <i>et al.</i> /2009 (Pereira <i>et al.</i> , 2009)	RCT	Média 19	30 (3 ^o M) T Adesivo Total-etch: 15 T Adesivo Self-etch: 15	7 dias (10 det) 30 dias (10 det) 60 dias (10 det)	T Adesivo Total-etch: Ác. Ortofs 37%+Scotchbond Multipurpose(3M) T Adesivo Self-etch: Clearfil SE Bond (Kuraray)	Sem avaliação	T Adesivo Total-E: sem reações inflamatórias visíveis T Adesivo Self-E: sem reações inflamatórias visíveis	Sem avaliação
Hebling <i>et al.</i> /1999 (Hebling, Giro e Costa, 1999)	RCT	12-25	32 (PM) T Adesivo: 18 T Ca(OH) ₂ : 12 C: 2 (s/ expo.)	7 dias (6+4+2 det) 30 dias (6+4 det) 60 dias (6+4 det)	T Adesivo: Ác. Ortofs 10%+Allbond ₂ T Ca(OH) ₂ : pasta Ca(OH) ₂ + Dycal (Dentsply)+Allbond ₂	T Adesivo: 100% assintomáticos C: 100% assintomáticos	Tep. 30 dias: T Adesivo: (<) 87.5% C: (<) 100% Tep. 90 dias: T Adesivo: (<) 87.5% C: (<) 100%	Tep. 30 dias: T Adesivo: (F+) 75%; (F+/-) 25% C: (F+) 100% Tep. 90 dias: T Adesivo: (F+) 37.5%; (F+/-) 50%; (F-) 12.5% C: (F+) 100%
Elias <i>et al.</i> /2007 (Elias <i>et al.</i> , 2007)	RCT	Média 25	26 (3 ^o M) T Adesivo: 16 T Ca(OH) ₂ : 10	30 dias (8+5 det) 90 dias (8+5 det)	T Adesivo: Clearfil SE Bond (Kuraray) T Ca(OH) ₂ : pó de Ca(OH) ₂ + Ca(OH) ₂ Cimento (Hidro C) + Clearfil SE Bond	Sem avaliação	Tep. 7 dias: T Adesivo: (>) 67% T Ca(OH) ₂ : (<) 68% Tep. 30 dias: T Adesivo: (>) 50% T Ca(OH) ₂ : (<) 100% Tep. 90 dias: T Adesivo: (>) 34% T Ca(OH) ₂ : (<) 100%	Tep. 7 dias: T Adesivo: (F-) 100% T Ca(OH) ₂ : (F+/-) 75% Tep. 30 dias: T Adesivo: (F+) 17%; (F+/-) 34%;(F-) 49% T Ca(OH) ₂ : (F+/-) 75%; (F-) 25% Tep. 90 dias: T Adesivo: (F+/-) 67%; (F-) 33% T Ca(OH) ₂ : (F+/-) 100%

RCT: *Randomized Controlled Trials*; T: grupo teste; C: grupo controlo; PM – dentes pré-molares; 3^o M – dentes terceiros molares; det – dentes; Tep. – tempo de estudo; (+) positivo; (-) negativo; (T+) Taxa de sucesso positiva; (T-) Taxa de sucesso negativa; (<) sem resposta inflamatória ou com resposta ligeira; (>) com resposta inflamatória intensa; (F+) formação de ponte dentinária; (F+/-) formação de algum tecido duro na zona de exposição; (F-) sem formação de tecido duro na zona de exposição.

Nos estudos selecionados observou-se que o número de dentes incluídos nas amostras de estudo variou entre 12 e 81 dentes; que o tipo de dentes escolhido foi o terceiro molar ou o pré-molar; e que a idade dos doentes incluídos nos estudos variou entre os 11 e os 30 anos. Relativamente aos tempos de estudo, verificou-se uma variação entre os 7 e os 90 dias. Todos os estudos incluíram grupos teste com sistemas de adesão dentinária, sejam os sistemas *total-etch* ou os *self-etch*, nos quais estes materiais foram comparados com grupos com cimentos à base de hidróxido de cálcio. Os sistemas adesivos *self-etch* foram utilizados em 4 estudos e os *total-etch* foram utilizados em 7 estudos, salientando-se, no entanto, um estudo em que foram comparados ambos. Nos estudos que utilizam a técnica *total-etch*, o ácido utilizado foi o ácido ortofosfórico a 37%, embora em dois deles tenha sido utilizado na concentração de 10%. A taxa de sucesso foi avaliada em 5 estudos, a resposta inflamatória foi avaliada em 9 estudos e a formação de ponte dentinária foi avaliada em 7 estudos. Num estudo foi, apenas, avaliada a expressão de colagénio tipo III e de fibronectina (Fernandes *et al.*, 2008). Assim, após a análise detalhada de todos os estudos RCT, foram incluídos 374 dentes, dos quais 245 eram pré-molares e 129 eram terceiros molares. Observando os resultados nos limites temporais máximos dos diversos estudos, que podem traduzir-se desde os 30 aos 90 dias, a taxa de sucesso dos sistemas de adesão dentinária variou entre 80% e 100% quando comparado com a taxa para os cimentos à base de hidróxido de cálcio de 100%. Relativamente há presença de resposta inflamatória intensa para dentes tratados com sistemas de adesão dentinária verificou-se uma variação entre 0% e 100% (média de 51%), em comparação com uma variação de 0% e 20% (média de 6%) para dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio. Relativamente à formação de ponte dentinária, em 6 dos 7 estudos que avaliaram este parâmetro, verificou-se não existir qualquer formação de tecido duro na zona de exposição; mas comparativamente, nos cimentos à base de hidróxido de cálcio verificou-se a formação de ponte dentinária numa variação entre 0% e 100% (média de 70,25%). Alguns autores demonstraram que em dentes tratados com sistemas de adesão dentinária não se verificou qualquer expressão de colagénio do tipo 3 e fibronectina, ao contrário do que se verificou em dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio, com o aumento da expressão dessas proteínas ao longo do tempo (Fernandes *et al.*, 2008).

Os 12 artigos que comparam as terapêuticas com outros materiais ou técnicas diversas, são todos ensaios clínicos controlados aleatorizados (do inglês *randomized controlled trials*— RCT), e podem ser analisados na Tabela 10.

Tabela 10: Dados extraídos dos estudos selecionados na revisão sistemática e que utilizam como biomaterial de estudo, para as terapêuticas de proteção pulpar, outros materiais ou técnicas diversas

Autor/Ano (referência)	Tipo de estudo	Idade dos doentes	Grupos de estudo (n°)	Tempos de estudo	Materiais/Técnicas	Resultados Clínicos/Histológicos/Radiográficos		
						Taxa de sucesso	Resposta inflamatória	Formação de ponte dentinária
Swarup <i>et al.</i> (Swarup <i>et al.</i> , 2014)	RCT	11-15	30 (PM) Ta – 10 Tb – 10 Tc – 10	15 dias (15 det) 30 dias (15 det)	Ta – Nano Hidroxiapatite (Orthogran) + CIV (CG Corporation) Tb – MTA (Angelus) + CIV (CG Corporation) Tc – Dycal (Dentsply) + CIV (CG Corporation)	Dentes clinicamente assintomáticos em todos os tempos	Tep. 15 dias: Ta – (>) 100% Tb – (<) 100% Tc – (>) 100% Tep. 30 dias: Ta – (<) 100% Tb – (<) 100% Tc – (<) 80%; (>) 20%	Tep. 15 dias: Ta – (F-) 20%; (F+/-) 80% Tb – (F+/-) 80%; (F+) 20% Tc – (f-) 80%; (F+/-) 20% Tep. 30 dias: Ta – (F+/-) 20%; (F+) 80% Tb – (F+/-) 20%; (F+) 80% Tc – (F-) 40%; (F+/-) 20%; (F+) 40%
Sübay <i>et al.</i> (Sübay e Aşci, 1993)	RCT	Sem informação	44 (1°PM) Ta – 22 Tb – 22	2 dias (4 det) 30 dias (20 det) 60 dias (20 det)	Ta – Bioapatite (PRED) + Kalzinol (Dentsply) + Lumicom (Bayer) Tb – Dycal (Dentsply) + Kalzinol (Dentsply) + Lumicom (Bayer)	Tep. 30 dias: Ta – 1 dente sintomatologia dolorosa Tb – 1 dente sintomatologia dolorosa Tep. 60 dias: Ta – 1 dente sintomatologia dolorosa Sem alterações radiográficas	Tep. 2 dias: Ta: (>) 100% Tb: (<) 50%; (>) 50% Tep 30 dias: Ta: (<) 11.1%; (>) 88.9% Tb: (<) 90%; (>) 10% Tep 60 dias: Ta: (<) 22.2%; (>) 77.8% Tb: (<) 100%	Tep. 30 dias: Ta: (F-) 100% Tb: (F+) 90% Tep. 60 dias: Ta: (F-) 100% Tb: (F+) 88.9%
Fransson <i>et al.</i> (Fransson, Petersson e Davies, 2011)	RCT	12-16	18 (PM) Ta – 9 Tb – 9	90 dias	Ta: Emdogain Gel (Biora) + disco teflon + óxido de zinco eugenol + Ketac Fil (3M) Tb: Ca(OH) ₂ + disco teflon + óxido de zinco eugenol + Ketac Fil (3M)	Detecção de DSP - Ta – perto da barreira de tecido duro 10(10); pré-dentina (8/8); áreas difusas perto da exposição (9/9) Tb - perto da barreira de tecido duro 10(10); pré-dentina (9/9); áreas difusas perto da exposição (9/9) Detecção de Colagêneo I Ta – perto da barreira de tecido duro 10(10); pré-dentina (8/8); áreas difusas perto da exposição (5/7) Tb - perto da barreira de tecido duro 10(10); pré-dentina (10/10); áreas difusas perto da exposição (6/6)		

Kiatwateeratana <i>et al.</i> (Kiatwateeratana <i>et al.</i> , 2009)	RCT	13-22	30 (1°PM) Ta: 15 Tb: 15	15 dias (30 det) 90 dias (28 det) 180 dias (26 det)	Ta: Emdogain Gel (Biora) + IRM (Dentsply) + Fugii LC (GC Corp) Tb: Ca(OH) ₂ + IRM (Dentsply) + Fugii LC (GC Corp)	Tep. 15 dias: Ta: HPS 40%; DET 3.3%; Tb: HPS 86.67%; DET 20% Tep. 90 dias: Ta: HPS 42.86%; DET 14.28%; Tb: HPS 71.43%; DET 14.28% Tep 180 dias: Ta: HPS 30.77%; DET 0% Tb: HPS 69.23%; DET 0%	Tep. 180 dias: Ta: (>) 100% (15/15) Tb: (<) 86.7% (13/15)	Tep. 180 dias: Ta: (F-) 100% Tb: (F+) 86.7%
Olsson <i>et al.</i> (Olsson <i>et al.</i> , 2005)	RCT	12-16	20 (PM) Ta - 9 Tb - 9 C: 2	90 dias	Ta: Emdogain Gel (Biora) + disco teflon + óxido de zinco eugenol + Ketac Fil (3M) Tb: Ca(OH) ₂ + disco teflon + óxido de zinco eugenol + Ketac Fil (3M) C: sem intervenção	Tep. 1 dia: Ta: 9/9 assintomáticos; Tb: 3/9 sintom. ligeira Tep. 15 dias: Ta: 3/9 sintom. ligeira; Tb: 7/9 sintom. ligeira e 1/9 sintom. Moderada Tep. 45 dias: Ta: 1/9 sintom. Ligeira; Tb: 4/9 sintom. Ligeira e 2/9 sintom. Moderada Tep. 90 dias: Ta: 1/9 sintom. Ligeira; Tb: 2/9 sintom. moderada	Tep. 90 dias: Ta: (<) 55.5% (5/9); (>) 45.5% (4/9) Tb: (<) 88.9% (8/9); 1 necrose	Tep 90 dias: Ta: (F+) 0% (0/9) Tb: (F+) 100% (9/9)
Lee <i>et al.</i> ((Lee <i>et al.</i> , 2015)	RCT	12-68	60 (Vários) Ta- 15 Tb - 15 Tc - 15 Td: 15 d	90 dias	Ta: exp.<1mm+PCL (sigma) +MTA+cavition (GC) Tb: exp.1-1.5mm+ PCL (sigma) +MTA+cavition (GC) Tc: : exp.<1mm+ MTA+ cavition (GC) Td: exp.1-1.5mm+MTA+ cavition (GC)	Sem avaliação	Sem avaliação	T90 dias: Ta: (F+) 100% (2.77mm) Tb: (F+) 100% (2.61mm) Tc: (F+) 100% (0.98mm) Td: (F+) 100% (0.93mm)
AlShwaimi <i>et al.</i> (AlShwaimi, Majeed e Ali, 2016)	RCT	15-25	36 (PM) Ta: 9 (perdeu 2) Tb: 10 Tc: 8 Tc: 9	8 dias 60 dias	Ta: BG (betametasona/gentamicina) + CIV (8 dias) - Tb: BG + CIV (60 dias) Tc: MTA + CIV (8 dias) Td: MTA + CIV (60 dias)	Sem avaliação	Ta: (>) 7/7 100% Abscesso 1/7 14% Tb: (>) 10/10 100% Abscesso 2/9 20% Tc: (>) 80% Td: (>) 80% Abscesso 1/9	Ta: (F+/-) 28.6%; (F-) 71.4% (7.19µm) Tb: (F+) 10%; (F+/-) 40%; (F-) 50% (22µm) Tc: (F+)100% (31.04µm) Td: (F+) 67%; (F+/-) 23% (78.5µm)
Parolia <i>et al.</i> (Parolia <i>et al.</i> , 2010)	RCT	15-25	36 (PM) Ta: 6 + 6 Tb: 6 + 6	15 dias (18det)	Ta: pó Propolis (LLC)+álcool 70% + CIV (Fuji)+compósito (Z100)	Sem avaliação	15 dias Ta: (<) 33%; (>) 67% Tb: (<) 83%; (>) 17%	15 dias Ta: (F+)33%; (F-) 67%

			Tc: 6 + 6	45 dias (18det)	Tb: MTA ProRoot (Dentsply) + CIV (Fuji)+compósito (Z100) Tc: Ca(OH) ₂ Dycal (Dentsply) + CIV (Fuji)+compósito (Z100)		Tc: (<) 17%; (>) 83% 45 dias Ta: (<) 83%; (>) 17% Tb: (<) 83%; (>) 17% Tc: Ta: (<) 33%; (>) 67%	Tb: (F+)50%; (F+/-)16.66%; (F-) 33.3% Tc: (F+) 16.50%; (F+/-)16.50%; (F-) 67% 45 dias Ta: Ta: (F+)83%; (F+/-) 17% Tb: (F+)83%; (F+/-)17% Tc: (F+)50%; (F+/-)33.33%; (F-) 16.66%
Santucci, Phillip (Santucci, 1999)	RCT	Sem informa.	93 (Vários) Ta: 29 Tb: 64	1 mês a 54 meses	Ta: Ca(OH) ₂ Dycal (Dentsply)+ compósito Tb: Nd:YAG laser+vitrebond (3M)+compósito	Ta: 1 mês (T+) 89.7%; 3 meses (T+) 79.4%; 6 meses (T+) 76%; 54 meses (T+) 43.6% Tb: 1 mês (T+) 98.4%; 3 meses (T+) 93.8%; 9 meses (T+) 90.3%; 54 meses (T+) 90.3%	Sem avaliação	Sem avaliação
Yazdanfar <i>et al</i> (Yazdanfar, Gutknecht e Franzen, 2015)	RCT	12-40	10 (Vários) Ta: 5 Tb: 5	1 mês 6 meses 12 meses	Ta: CIV — (Vitrebond - 3M) Tb: Laser diode 808nm + CIV (Vitrebond — 3M)	Tep. 12 meses: Ta: (T+)3/5 60% Tb: (T+) 5/5 100%	Sem avaliação	Sem avaliação
Moritz <i>et al</i> (Moritz <i>et al.</i> , 1998)	RCT	Ta: 15-65 Tb: 9-68	260 (Vários) Exp.-1mm- 1.2mm Ta: 130 (100 — 24 meses) Tb: 130 (100 — 24 meses)	8 dias 18 meses 24 meses	Ta: Co ₂ laser+ Ca(OH) ₂ Life®(Kerr)+CIV (KetacFil — 3M) Tb: Ca(OH) ₂ Life®(Kerr)+CIV (KetacFil — 3M)	Tep. 24 meses: Ta: (T+) 93/100 93%; (T-) 7/100 7% Tb: (T+) 68/100 68%	Sem avaliação	Sem avaliação
Olivi <i>et al</i> (Olivi <i>et al.</i> , 2007)	RCT	T: 11-18 C: 19-40	64 (Vários) Ta:11/Ca:10 Tb:15/Cb:10 Tc: 8/Cc: 10	1 mês 3 meses 6 meses 12 meses 2 anos 4 anos	Ta: Ca(OH) ₂ Life®(Kerr) Tb: Er,Cr:YSGG laser + Ca(OH) ₂ Life®(Kerr) Tc: Erbium:YAG laser+ Ca(OH) ₂ Life®(Kerr)	Tep. 4 anos: Ta: (T+) 7/11 63% / Ca: (T+) 5/10 50% Tb: (T+) 12/15 80% / Cb: (T+) 8/10 80% Tc: (T+) 6/8 75% / Cc: (T+) 7/10 70%	Sem avaliação	Sem avaliação

RCT: *Randomized Controlled Trials*; T: grupo teste; C: grupo controle; PM — dentes pré-molares; 3° M — dentes terceiros molares; det — dentes; Tep. — tempo de estudo; (+) positivo; (-) negativo; (T+) Taxa de sucesso positiva; (T-) Taxa de sucesso negativa; HPS — hipersensibilidade pós-operatória; DET — Dor espontânea transitória; (<) sem resposta inflamatória ou com resposta ligeira; (>) com resposta inflamatória intensa; (F+) formação de ponte dentinária; (F+/-) formação de algum tecido duro na zona de exposição; (F-) sem formação de tecido duro na zona de exposição

Nos estudos selecionados observou-se que o número de dentes incluídos nas amostras de estudo variou entre 10 e 260 dentes; que o tipo de dentes escolhido foi o pré-molar, ou grupos heterogêneos; e que a idade dos doentes incluídos nos estudos varia entre os 11 e os 68 anos. Relativamente aos tempos de estudo, verificou-se uma variação entre os 2 dias e os 56 meses. Todos os estudos incluíram grupos teste com diversos biomateriais como a hidroxiapatite, as proteínas morfogenéticas do esmalte, os polímeros, e os produtos resultantes de fórmulas farmacêuticas magistrais. Outros estudos incluíram técnicas de remoção do tecido cariado e desinfecção com diversos tipos de *laser*. Em todos os estudos foram utilizados estes biomateriais ou técnicas, comparando-os com biomateriais à base de hidróxido de cálcio, de agregados trióxidos minerais ou de ionómeros de vidro. A hidroxiapatite foi utilizada em 2 estudos, as proteínas morfogenéticas de esmalte foram utilizadas em 3 estudos, os polímeros à base de caprolactona foram utilizados num estudo, os produtos resultantes de formulações farmacêuticas magistrais foram utilizados num estudo, e as técnicas com *laser* foram utilizadas em 4 estudos. A taxa de sucesso foi avaliada em 7 estudos, a resposta inflamatória foi avaliada em 5 estudos e a formação de ponte dentinária foi avaliada em 6 estudos. Num estudo foi apenas avaliada a expressão e localização de DSP e de colagénio do tipo I (Fransson, Petersson e Davies, 2011). Assim, após a análise detalhada de todos os estudos RCT, foram incluídos 665 dentes, dos quais 178 eram pré-molares e 487 eram grupos de dentes heterogêneos. Observando os resultados nos limites temporais máximos dos diversos estudos, que podem traduzir-se desde os 30 dias aos 56 meses, a taxa de sucesso referente aos estudos que utilizam o *laser* variou entre 75% e 100% (média de 88%). Noutros estudos, a taxa de sucesso é avaliada apenas através da pesquisa de sintomatologia dolorosa variando desde ausência de sintomatologia a 30,8% de hipersensibilidade pós-operatória. Relativamente há presença de resposta inflamatória intensa para dentes tratados com hidroxiapatite, varia desde 0% a 77,8%, em comparação com uma variação de 0% a 20% para dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio e de agregados trióxidos minerais. Relativamente à presença de resposta inflamatória intensa para dentes tratados com proteínas morfogenéticas de esmalte varia desde 45,5% a 100%, em comparação com uma variação de 12% a 15% para dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio. A resposta inflamatória intensa foi avaliada, apenas,

em mais um estudo que utiliza produtos à base de corticoides e de antibióticos com resultados de 100%, comparados com dentes tratados com cimentos à base de MTA com resultados de 80%. Relativamente à formação de ponte dentinária verificou-se a sua edificação completa em dentes tratados com hidroxiapatite numa variação entre 0% e 80%, em comparação com valores de 40% e 88% para dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio e com valores de 80% para dentes tratados com cimentos à base de MTA. Relativamente à formação de ponte dentinária verificou-se que em dentes tratados com proteínas morfogenéticas de esmalte não ocorreu formação de tecido duro na zona de exposição, em comparação com valores de 87% e 100% para dentes tratados com cimentos à base de hidróxido de cálcio.

Ainda, para dentes tratados com polímeros verificou-se que a edificação de ponte dentinária era de 10%, em comparação com valores de 67% em dentes tratados com cimentos à base de MTA. Em dentes tratados com proteínas morfogenéticas de esmalte, alguns autores detetaram a expressão de DSP e de colagénio do tipo I, localizando-os perto da barreira de tecido duro e de pré-dentina, tal como em relação aos cimentos a base de hidróxido de cálcio, com os quais os compararam (Fransson, Petersson e Davies, 2011).

Avaliação da qualidade dos estudos

A avaliação da qualidade dos estudos foi realizada através dos critérios da *Cochrane Collaboration Risk of Bias* para a avaliação de risco de viés. Esta avaliação foi realizada de acordo com a revisão sistemática, isto é, para cada uma das comparações efetuadas com biomateriais, sistemas de adesão dentinária e outras terapêuticas utilizadas na proteção pulpar direta (Faber *et al.*, 2016; Slim *et al.*, 2003).

Os resultados da avaliação da qualidade dos ensaios clínicos controlados aleatorizados (RCT) da revisão sistemática que utilizou os cimentos à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de agregados trióxidos minerais podem observar-se na Figura 42.

Para esta avaliação foram escrutinados 11 estudos, os quais foram mencionados como aleatorizados. No entanto, num deles ocorreram falhas na descrição da metodologia de geração de uma sequência aleatória para a escolha dos participantes e, em 4, não foram apresentadas informações suficientes sobre esta metodologia.

INDUTORES DA DENTINOGÊNESE EM PROTEÇÕES PULPARES DIRETAS

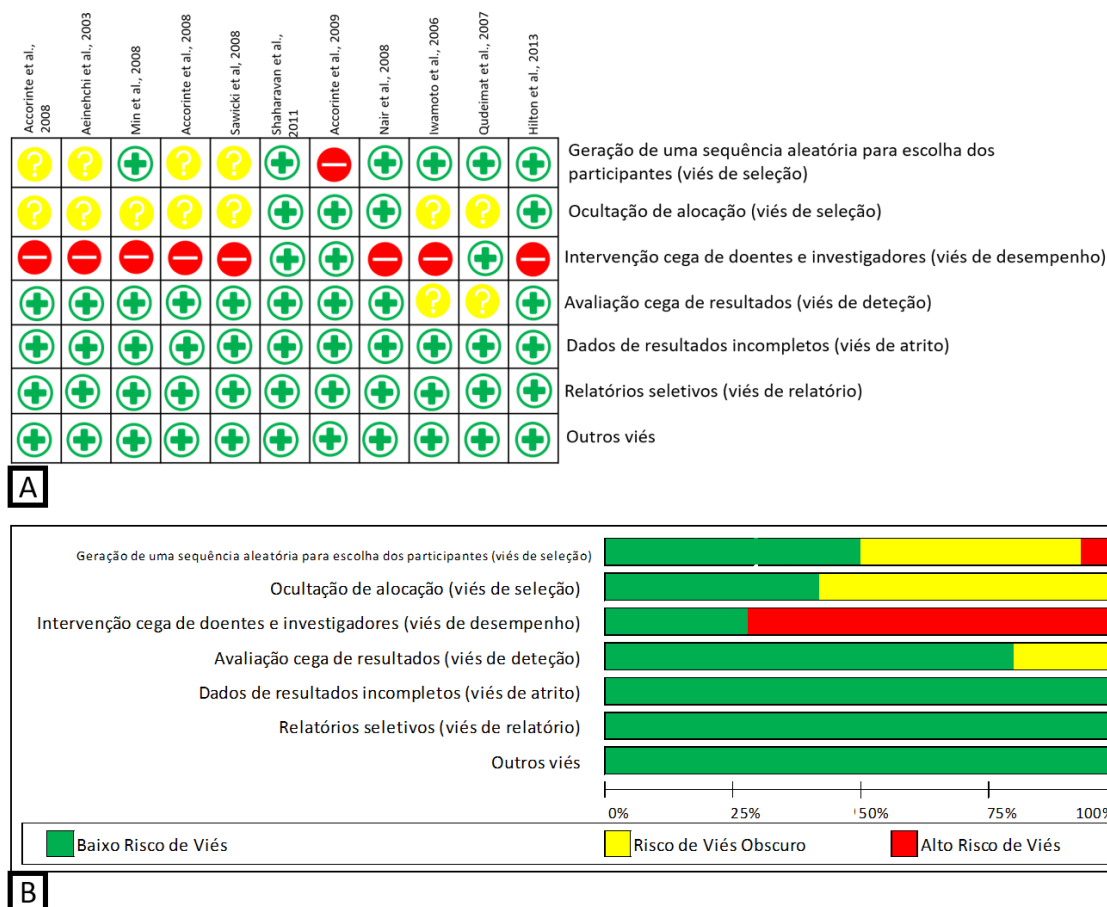


Figura 42: Resultados da avaliação da qualidade dos estudos da revisão sistemática que utiliza para terapêuticas de proteção pulpar, os biomateriais de estudo: os cimentos à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de agregados trióxidos minerais. Nesta avaliação utilizou-se o esquema do Risco de Viés da *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (version 5.1.0)*: (A) Sumário do risco de viés; (B) Avaliação geral do risco de viés.

A ocultação da alocação não foi explicada devidamente em sete desses estudos. A intervenção cega de doentes e investigadores nos procedimentos clínicos foi impossível em 8 estudos, uma vez que as características de manipulação dos biomateriais eram difíceis de dissimular. A avaliação cega dos resultados só não foi possível em dois estudos, os quais não apresentavam informações suficientes para esta avaliação. Assim, o viés de deteção considerou-se de baixo risco. O viés de atrito, o viés de relatório e outros viés consideraram-se de baixo risco em todos os estudos escrutinados.

A qualidade dos estudos de coorte foi avaliada de acordo com o índice metodológico para ensaios não aleatorizados (do inglês *Methodological Index for Non-Randomized Studies – MINORS*) (Slim *et al.*, 2003), como se pode observar na Tabela 11.

Tabela 11: Versão MINORS revista e validada aplicada aos estudos de coorte (Slim *et al.*, 2003) da revisão sistemática que utiliza como biomateriais de estudo, para terapêuticas de proteção pulpar, os cimentos à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de agregados trióxidos minerais.

Estudos de Coorte	Itens metodológicos para estudos não aleatorizados - PONTUAÇÃO							
	Marques et al., 2015	Farsi et al., 2006	Bogen et al., 2008	Mente et al., 2014	Hörsted et al., 1985	Mente et al., 2010	Miles et al., 2010	Dammaschke et al., 2010
Objetivo claramente indicado	2	2	2	2	2	2	2	2
Inclusão de doentes consecutivos	2	0	1	2	1	2	2	1
Colheita prospetiva de dados	2	2	2	2	2	2	2	2
Endpoints apropriados ao objetivo de estudo	1	2	2	2	2	2	2	2
Avaliação sem enviesamento dos endpoints de estudo	1	0	2	2	1	2	1	1
Período de <i>follow-up</i> adequado ao objetivo de estudo	2	2	2	2	2	2	2	2
Perdas no <i>follow-up</i> de menos de 5%	0	2	0	0	0	0	0	0
Cálculo prospetivo do tamanho da amostra do estudo	0	0	0	1	0	0	0	0
Critérios adicionais no caso de estudos comparativos								
Grupo controlo adequado	-	-	-	2	-	2	-	-
Grupos contemporâneos	-	-	-	2	-	2	-	-
Equivalência de base dos grupos	-	-	-	0	-	1	-	-
Adequada análise estatística	-	-	-	2	-	2	-	-
PONTUAÇÃO TOTAL	10	10	11	19	10	19	11	10

Dos estudos de coorte incluídos na revisão sistemática, apenas dois deles são estudos comparativos. Em ambos, obteve-se uma classificação MINORS para a qualidade de estudo de 19 pontos. Nos outros 6 estudos, a classificação MINORS para a qualidade dos mesmos foi entre 10 a 11 pontos, dos 16 pontos possíveis e considerados ideais. Os itens metodológicos para os estudos aleatorizados com classificações mais baixas e, portanto, consideradas como lacunas

na robustez dos estudos, foram as perdas no *follow-up* maiores de 5% e a inexistência dos cálculos prospectivos do tamanho das amostras de estudo.

Os resultados da avaliação da qualidade dos ensaios clínicos controlados aleatorizados (RCT) da revisão sistemática que utiliza os cimentos à base de silicato tricálcico e os cimentos à base de agregados trióxidos minerais podem observar-se na Figura 43.

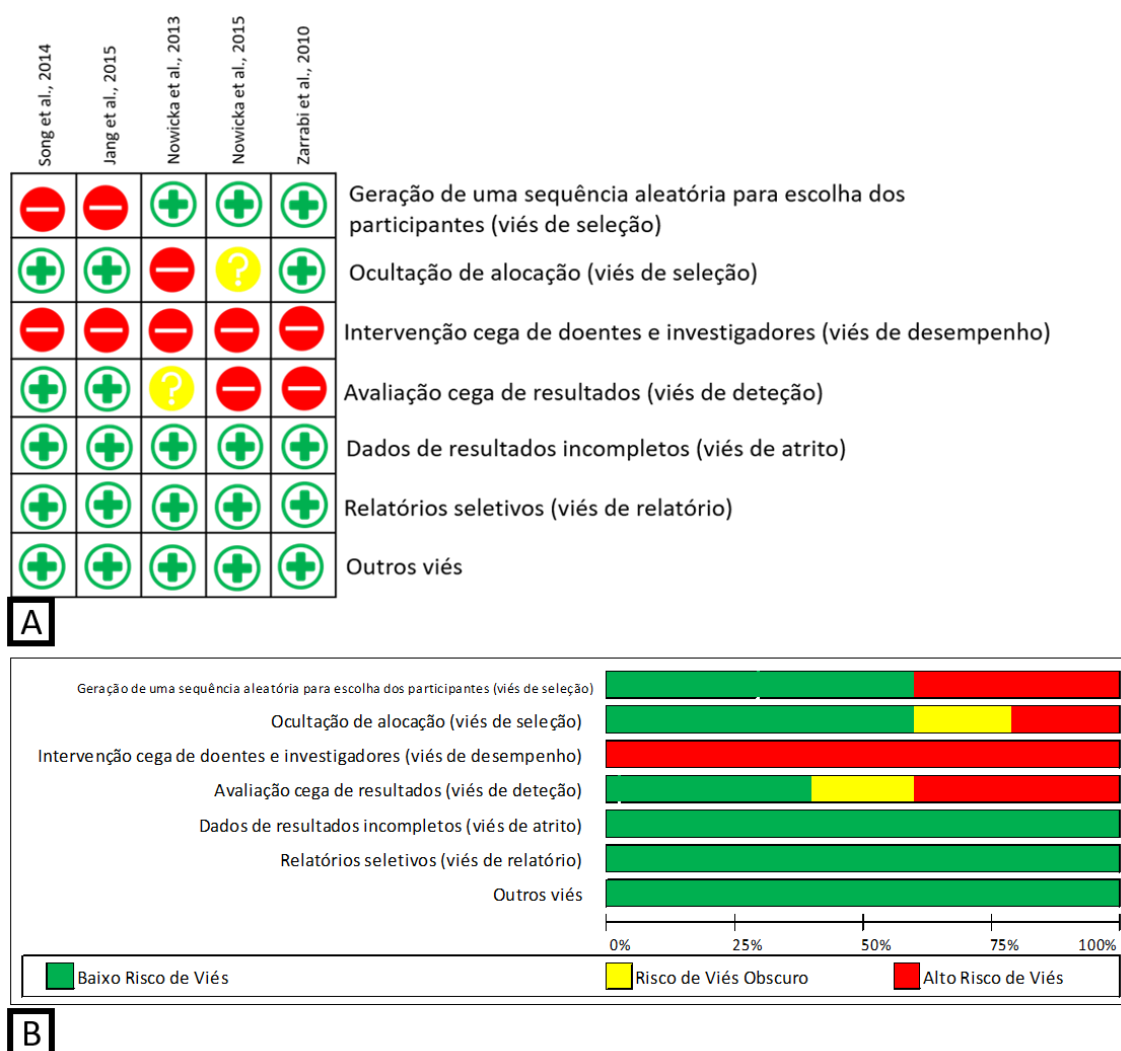


Figura 43: Resultados da avaliação da qualidade dos estudos da revisão sistemática que utiliza para terapêuticas de proteção pulpar, os biomateriais de estudo: cimentos à base de silicatos tricálcicos e cimentos à base de agregados trióxidos minerais. Nesta avaliação utilizou-se o esquema do Risco de Viés da *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (version 5.1.0)*: (A) Sumário do risco de viés; (B) Avaliação geral do risco de viés.

Nesta avaliação foram escrutinados 5 estudos aleatorizados. Foram observadas falhas na descrição da metodologia de geração de uma sequência aleatória para a escolha dos participantes em três deles. A ocultação da alocação não foi efetuada num estudo e não foi explicada devidamente noutro. A intervenção cega de doentes e investigadores nos procedimentos clínicos foi impossível em todos estudos, devido às características de manipulação dos biomateriais indissimuláveis. A avaliação cega dos resultados não foi realizada em dois estudos, e um deles não apresentava informações suficientes para esta avaliação. O viés de atrito, o viés de relatório e outros viés consideraram-se de baixo risco em todos os estudos escrutinados.

Os resultados da avaliação da qualidade dos ensaios clínicos controlados aleatorizados (RCT) da revisão sistemática que utiliza os sistemas de adesão dentinária e os cimentos à base de hidróxido de cálcio podem observar-se na Figura 44.

Para esta avaliação foram escrutinados 10 estudos, os quais foram mencionados como aleatorizados. No entanto, num deles ocorreram falhas na descrição da metodologia de geração de uma sequência aleatória para a escolha dos participantes e, em 7 não foram apresentadas informações suficientes sobre esta metodologia. A ocultação da alocação não foi explicada devidamente em 6 desses estudos. A intervenção cega de doentes e investigadores nos procedimentos clínicos foi impossível em 7 estudos, devido à dificuldade em dissimular as características de manipulação dos biomateriais, e em dois deles não foi dada informação suficiente. A avaliação cega dos resultados só não foi possível em dois estudos, os quais não apresentavam informações suficientes para esta avaliação. Assim, o viés de deteção considerou-se de baixo risco. O viés de atrito, o viés de relatório e outros viés consideraram-se de baixo risco em todos os estudos escrutinados.

Os resultados da avaliação da qualidade dos ensaios clínicos controlados aleatorizados (RCT) da revisão sistemática que utiliza outros materiais e técnicas para terapêuticas de proteções pulpar diretas podem observar-se na Figura 45.

INDUTORES DA DENTINOGENESE EM PROTEÇÕES PULPARES DIRETAS

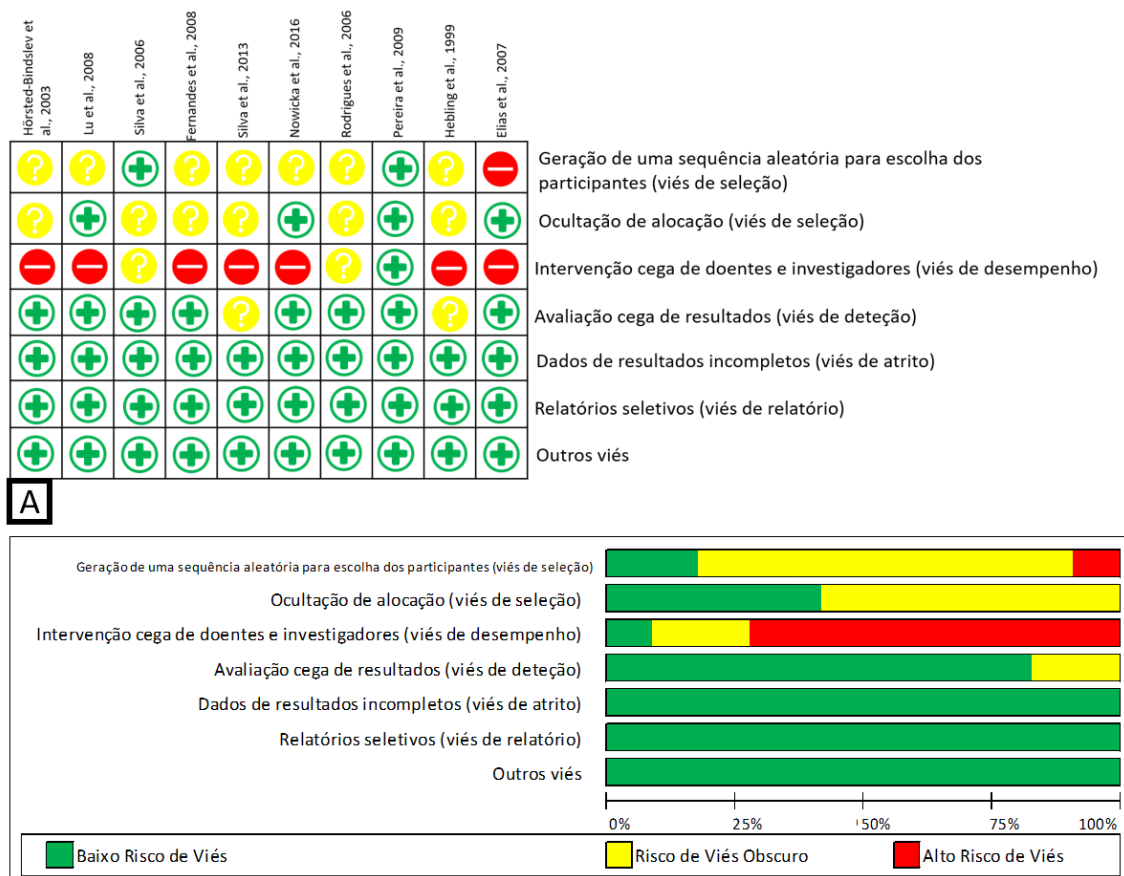


Figura 44: Resultados da avaliação da qualidade dos estudos da revisão sistemática que utiliza para terapêuticas de proteção pulpar, os biomateriais de estudo: sistemas de adesão dentinária e cimentos à base de hidróxido de cálcio. Nesta avaliação utilizou-se o esquema do Risco de Viés da *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (version 5.1.0)*: (A) Sumário do risco de viés; (B) Avaliação geral do risco de viés.

Para esta avaliação foram escrutinados 12 estudos, os quais foram mencionados como aleatorizados. No entanto, em três deles ocorreram falhas na descrição da metodologia de geração de uma sequência aleatória para a escolha dos participantes e, em 7 não foram apresentadas informações suficientes sobre esta metodologia. A ocultação da alocação não foi explicada devidamente em 5 desses estudos, havendo mesmo um que foi considerado com alto risco de viés de seleção. A intervenção cega de doentes e investigadores nos procedimentos clínicos foi impossível em 9 estudos, devido à dificuldade em dissimular as características de manipulação dos biomateriais, e num deles não foi dada informação suficiente acerca desta metodologia.

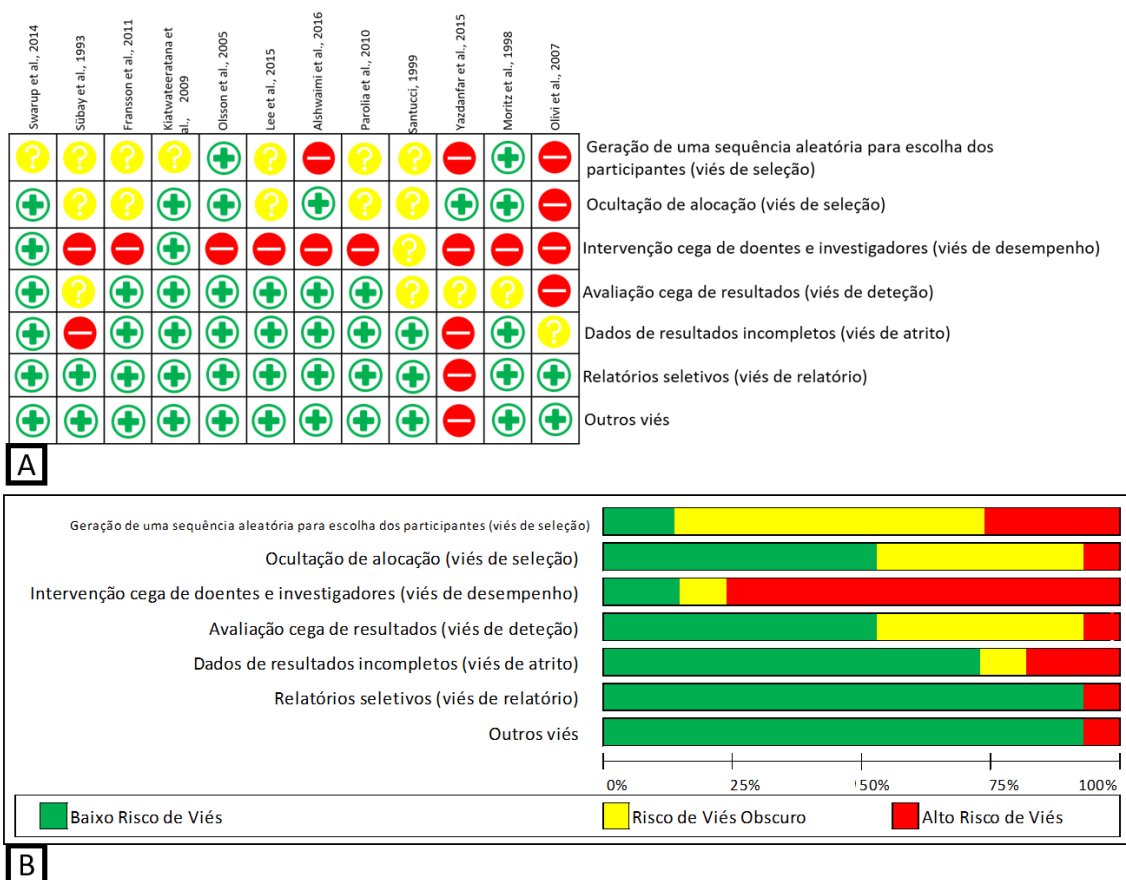


Figura 45: Resultados da avaliação da qualidade dos estudos da revisão sistemática que utiliza para terapêuticas de proteção pulpar, outros materiais ou terapêuticas. Nesta avaliação utilizou-se o esquema do Risco de Viés da *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (version 5.1.0)*: (A) Sumário do risco de viés; (B) Avaliação geral do risco de viés.

A avaliação cega dos resultados não foi possível num estudo, e quatro deles não apresentavam informações suficientes para esta avaliação. Foram detetados dois estudos com dados de resultados incompletos, um com um relatório seletivo e, ainda outro com a possibilidade de outros tipos de viés. Ainda assim, o viés de atrito, o viés de relatório e outros viés consideraram-se de baixo risco.

Meta-análise

A avaliação quantitativa dos estudos da revisão sistemática foi efetuada separadamente de acordo com a sistematização das terapêuticas já realizada. As meta-análises efetuadas

tiveram como objetivo avaliar o sucesso clínico das terapêuticas de proteção pulpar com diversos biomateriais e outros materiais, tendo em conta três fatores: formação de ponte dentinária, ausência de sinais inflamatórios e taxa de sucesso.

Assim, foi efetuada uma meta-análise para comparar a taxa de sucesso clínico tendo em conta os três fatores referidos, entre os cimentos à base de agregado trióxidos minerais e os cimentos à base de hidróxido de cálcio, como se pode observar na Figura 46.

Meta-analysis Cimento MTA vs Cimento CaOH

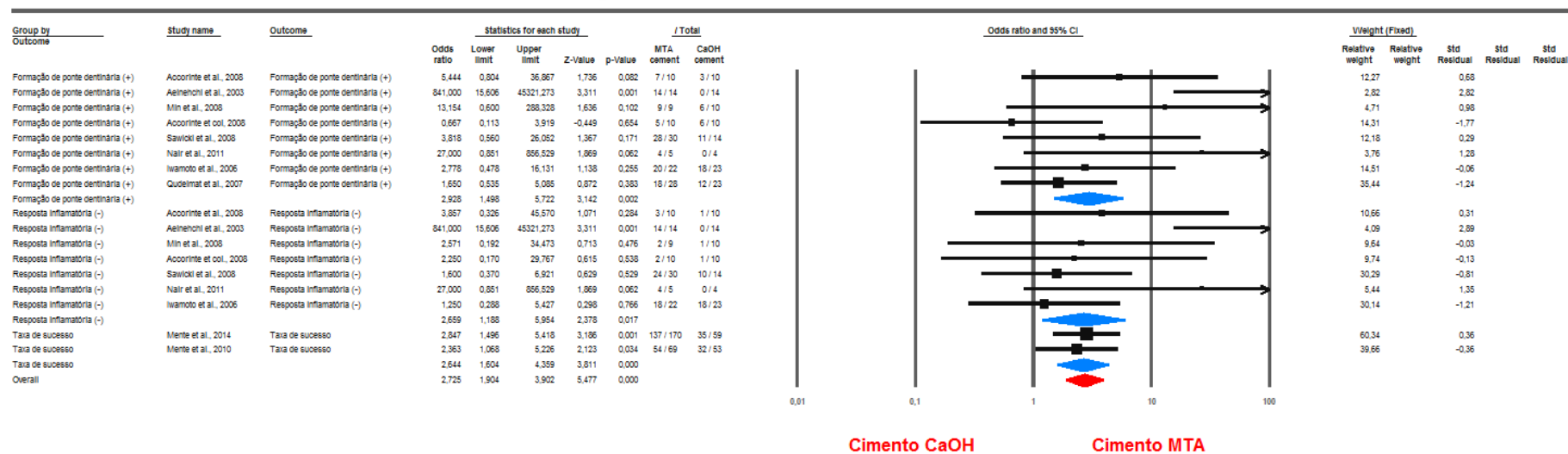


Figura 46: Diagrama *Forest Plot of Odds Ratio* para meta-análise do sucesso clínico do cimento à base de MTA vs. cimentos à base de hidróxido de cálcio. Neste diagrama são avaliados outros parâmetros individualmente, tais como formação de ponte dentinária, resposta inflamatória negativa e taxa de sucesso positiva. CI=Intervalo de confiança; MTA=cimento à base de agregado trióxido mineral; CaOH=cimento à base de hidróxido de cálcio. Nesta avaliação utilizou-se o *software Comprehensive Meta-Analysis version 3*.

Dos 19 estudos incluídos na revisão sistemática referentes a estes dois biomateriais, apenas 10 foram escrutinados na meta-análise. Os critérios de exclusão dos estudos, nesta fase, foram a não comparação dos dois biomateriais e os resultados não mensuráveis dos mesmos. Nesta análise foram incluídos estudos controlados aleatorizados e estudos de coorte.

Os 10 estudos avaliaram 557 dentes, nos quais se compararam as taxas de sucesso clínico das terapêuticas de proteção pulpar, utilizando cimentos à base de hidróxido de cálcio ou cimentos à base de agregados trióxidos minerais. De acordo com o método estatístico qui-quadrado, os resultados mostraram não heterogeneidade [$df(Q) = 16$; $P\text{-value} = 0,055$; $I\text{-Squared} = 38,23$; $Tau\text{-squared} = 0,397 \pm 0,405$]. Cada um dos parâmetros analisados mostrou-se significativamente aumentado nas terapêuticas com cimentos à base de MTA quando comparadas com as realizadas com cimentos à base de hidróxido de cálcio [Formação de ponte dentinária $OR=2,92$ (95%CI; 1,49-5,72; $P=0,002$); Ausência de resposta inflamatória $OR=2,65$ (95%CI; 1,18-5,95; $P=0,017$); Taxa de sucesso $OR=2,64$ (95%CI; 1,60-4,35; $P=0,000$)].

De forma global, analisando-se os três critérios em conjunto verificou-se que os cimentos à base de MTA têm desempenhos clínicos mais positivos do que os cimentos à base de hidróxido de cálcio, com significância estatística ($OR=2,72$; 95%CI; 1,90-3,90; $P=0,000$).

Foi também efetuada uma meta-análise para comparar a taxa de sucesso clínico, tendo em conta os três fatores referidos, entre os cimentos à base de silicato tricálcico e os cimentos à base de agregado trióxidos minerais, como se pode observar na Figura 47.

Meta-analysis Cimentos de silicato tricálcio vs MTA

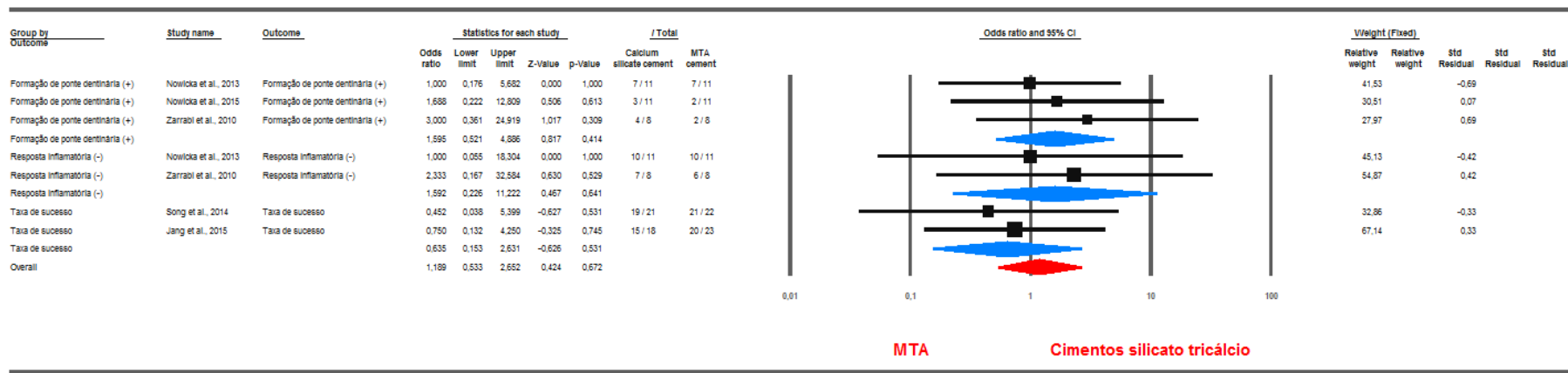


Figura 47: Diagrama *Forest Plot of Odds Ratio* para meta-análise do sucesso clínico de cimento à base de silicato tricálcio vs. cimento à base de MTA. Neste diagrama são avaliados outros parâmetros individualmente, tais como formação de ponte dentinária, resposta inflamatória negativa e taxa de sucesso positiva. CI=Intervalo de confiança; MTA=cimento à base de agregado trióxido mineral. Nesta avaliação utilizou-se o *software Comprehensive Meta-Analysis version 3*.

Dos 5 estudos incluídos na revisão sistemática referentes a estes dois biomateriais, todos foram escrutinados na meta-análise. Assim, nesta análise foram, apenas, incluídos estudos controlados aleatorizados. Os 5 estudos avaliaram 144 dentes, nos quais se compararam as taxas de sucesso clínico das terapêuticas de proteção pulpar, utilizando cimentos à base de silicato tricálcico ou cimentos à base de agregados trióxidos minerais.

De acordo com o método estatístico qui-quadrado, os resultados mostraram não heterogeneidade [df(Q) – 6; *P-value* – 0,919; *I-Squared* – 0,000; *Tau-squared* – 0,000±0,692]. Dois dos parâmetros analisados mostraram-se aumentados nas terapêuticas com cimentos à base de silicato tricálcico quando comparadas com as realizadas com cimentos à base de MTA, mas sem significado estatístico [formação de ponte dentinária OR=1,59 (95%CI; 0,52-4,88; P=0,414); ausência de resposta inflamatória OR=1,59 (95%CI; 0,22-11,22; P=0,641)]. Apenas um parâmetro se mostrou aumentado nas terapêuticas com cimento à base de MTA quando comparadas com as realizadas com cimentos à base de silicato tricálcico, mas sem significado estatístico [taxa de sucesso OR=0,63 (95%CI; 0,15-2,63; P=0,531)].

De forma global, analisando-se os três critérios em conjunto verificou-se que os cimentos à base de silicato tricálcico têm desempenhos clínicos mais positivos do que os cimentos à base de MTA, mas sem significado estatístico (OR=1,18; 95%CI; 0,53-2,65; P=0,672).

Da mesma forma foi, também, efetuada uma meta-análise para comparar a taxa de sucesso clínico, tendo em conta os três fatores referidos, entre os sistemas de adesão dentinária e os cimentos à base de hidróxido de cálcio, como se pode observar na Figura 48.

Meta-análise Sistemas de adesão dentinária vs Cimentos de hidróxido de cálcio

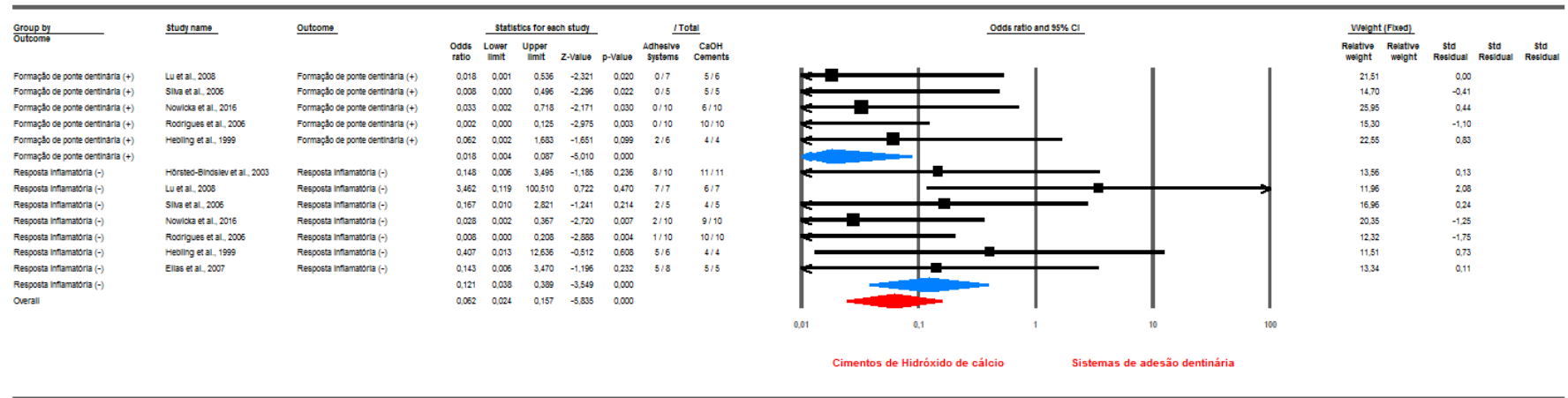


Figura 48: Diagrama Forest Plot of Odds Ratio para meta-análise do sucesso clínico de sistemas de adesão dentinária vs. cimento à base de hidróxido de cálcio. Neste diagrama são avaliados outros parâmetros individualmente, tais como formação de ponte dentinária e a resposta inflamatória negativa. CI=Intervalo de confiança; CaOH=cimento à base de hidróxido de cálcio. Nesta avaliação utilizou-se o software Comprehensive Meta-Analysis version 3.

Dos 10 estudos incluídos na revisão sistemática referentes a estes dois biomateriais, apenas 7 foram escrutinados na meta-análise. Os critérios de exclusão dos estudos, nesta fase, foram a não comparação dos dois materiais e os resultados não mensuráveis dos mesmos. Nesta análise foram apenas incluídos estudos controlados aleatorizados.

Os 7 estudos avaliaram 107 dentes, nos quais se compararam as taxas de sucesso clínico das terapêuticas de proteção pulpar, utilizando sistemas de adesão dentinária ou cimentos à base de hidróxido de cálcio. De acordo com o método estatístico qui-quadrado, os resultados mostraram não heterogeneidade [df (Q) – 6; *P-value* – 0,668; *I-Squared* – 0,000; *Tau-squared* – 0,000±1,753]. Cada um dos parâmetros analisados mostrou-se significativamente aumentado nas terapêuticas com cimentos à base de hidróxido de cálcio quando comparadas com as realizadas com sistemas de adesão dentinária [Formação de ponte dentinária OR=0,018 (95%CI; 0,004-0,087; P=0,000); ausência de resposta inflamatória OR=0,121 (95%CI; 0,038-0,389; P=0,000)].

De forma global, analisando-se os dois critérios em conjunto verificou-se que os cimentos à base de hidróxido de cálcio têm desempenhos clínicos mais positivos do que os sistemas de adesão dentinária, com significância estatística (OR=0,062; 95%CI; 0,024-0,157; P=0,000).

Avaliação do risco de enviesamento dos estudos

O viés de publicação existe devido ao facto de estudos com resultados estatisticamente significativos serem mais vezes submetidos a publicação e terem mais interesse em serem publicados, do que os estudos com resultados nulos ou não significativos. Este facto pode comprometer a validade das revisões sistemáticas assim como das análises quantitativas com meta-análise, uma vez que estas técnicas se baseiam em estudos publicados (Li *et al.*, 2015).

A meta-análise efetuada, por um lado, incluiu ensaios clínicos controlados aleatorizados e estudos de coorte todos publicados, e por outro lado, a pesquisa foi baseada nas bases de dados acima referidas com restrição da linguagem. Estes fatores podem aumentar o risco de viés de publicação. Para detetar o viés de publicação elaboraram-se gráficos *funnel plot asymmetry* para cada uma das meta-análises efetuadas e que podem ser observados na Figura 49.

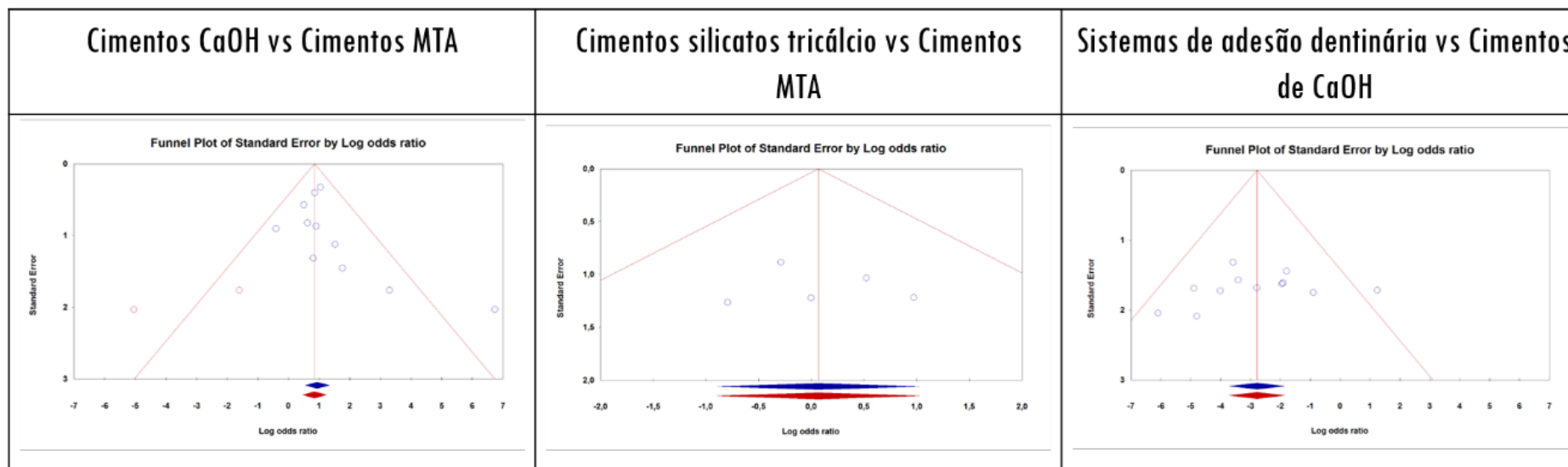


Figura 49: Diagrama representativo dos gráficos referentes ao viés de publicação (*funnel plots asymmetry*) dos estudos incluídos na meta-análise (cimentos de CaOH vs. cimentos MTA, cimentos de silicatos tricálcio vs. cimentos MTA e, sistemas de adesão dentinária vs. cimentos de CaOH). Esta análise foi efetuada utilizando o *Comprehensive Meta-Analysis version 3* (Software CMA, Biostat, Englewood, USA).

Os *funnel plots* representados na figura 49 são diagramas de dispersão do efeito estimado de cada estudo individualmente em relação ao tamanho ou precisão de cada um desses estudos. Cada ponto representa um estudo, isto é, a medida do efeito de cada biomaterial. O eixo das ordenadas (Y) refere-se à precisão do estudo, isto é, o erro padrão ou o tamanho da amostra. O eixo das abcissas (X) refere-se aos resultados do estudo, isto é, o efeito do biomaterial. Neste eixo está, ainda, representada uma linha vertical que corresponde ao resultado nulo do efeito estimado da terapêutica. O erro padrão do efeito estimado é frequentemente escolhido como a medida do tamanho do estudo, e marcado ao longo do eixo vertical de escala invertida, que coloca os estudos maiores e mais robustos no topo. O efeito estimado para os estudos mais pequenos deve espalhar-se mais amplamente no fundo do gráfico. Na ausência de viés e entre a heterogeneidade dos estudos, a dispersão irá ocorrer apenas devido à variação de amostragem e a o gráfico assemelha-se a um funil invertido simétrico. As linhas oblíquas representam os limites do intervalo de confiança de 95% à volta do resultado da terapêutica (Sterne *et al.*, 2011; Sterne e Egger, 2001).

Relativamente ao gráfico de dispersão da meta-análise que comparou as terapêuticas de cimentos de CaOH *vs.* cimentos MTA, verificou-se que existe uma ausência de heterogeneidade, uma vez que a maioria dos estudos estão dentro dos intervalos de confiança de 95%. Pela observação do gráfico, apenas dois deles estão fora, mas ainda assim, de forma simétrica e com amostras pequenas. A maioria dos estudos têm amostras grandes, isto é, erro padrão perto de zero. Assim, verificou-se que existe um elevado grau de simetria e, portanto, a não existência de viés de publicação.

Quanto à meta-análise que comparou as terapêuticas de cimentos de silicatos tricálcico *vs.* cimentos de MTA, verificou-se a ausência de heterogeneidade, uma vez que todos os estudos se encontram dentro do intervalo de confiança de 95%. A simetria deste gráfico de dispersão revelou a total ausência de viés de publicação, verificando-se, no entanto, uma fraca precisão da meta-análise devido ao tamanho reduzido das amostras.

O *funnel plot* da meta-análise que comparou as terapêuticas de sistemas de adesão dentinária *vs.* cimentos de CaOH revelou a ausência de heterogeneidade, uma vez que a maioria dos estudos se encontram dentro no intervalo de confiança. No entanto, observou-se uma

assimetria ligeira do gráfico de dispersão, o que revela viés de publicação. Além disso, a maioria dos estudos revelaram um erro padrão mediano, isto é, o tamanho da amostra não é grande, o que diminui a robustez da meta-análise.

Discussão

O tecido pulpar é constituído por um tecido conjuntivo não mineralizado e que possui inúmeras funções importantes tais como: a indução da formação de dentina; a nutrição e a defesa do órgão dentário; e a capacidade sensitiva do mesmo (Swarup *et al.*, 2014; Zhu, Ju e Ni, 2015). Estas funções são fundamentais na dinâmica da cavidade oral e, por isso, a preservação da vitalidade deste tecido reveste-se de uma importância significativa. A exposição do tecido pulpar, quer por traumatismo ou por ação mecânica iatrogénica, quer por lesões cariosas, se não tratada corretamente, pode dar origem a lesões irreversíveis do tecido pulpar. A proteção pulpar direta tem demonstrado ser uma terapêutica efetiva e eficaz na manutenção da vitalidade do órgão pulpar, quando convenientemente efetuada. A terapêutica é considerada um sucesso quando o órgão dentário se mantém vital, assintomático e com formação de uma ponte dentinária no local de exposição, num tempo de *follow up* de 75 a 90 dias (Pameijer e Stanley, 1998; Zhu, Ju e Ni, 2015).

Ao longo dos anos, têm sido vários os biomateriais e as técnicas propostas para efetuar esta terapêutica, nomeadamente, os cimentos à base de hidróxido de cálcio, os cimentos à base de MTA, os sistemas de adesão dentinária, os cimentos à base de silicato tricálcico, as proteínas da matriz do esmalte, a hidroxiapatite, as formulações magistrais com corticoides e antibióticos e algumas técnicas com luz *laser*. O objetivo desta revisão sistemática foi encontrar, através da evidência científica, os biomateriais e/ou as técnicas mais adequadas e com melhores desempenhos clínicos, na preservação da vitalidade do órgão pulpar. Por ser tão abrangente e com a inclusão de todos os biomateriais e técnicas conhecidas, foi necessário dividir este estudo em quatro partes e em cada uma elaborar uma meta-análise, quando possível, para poder ser

efetuada uma recomendação para a prática clínica. A maioria dos estudos incluídos nas diversas revisões sistemáticas são estudos RCTs. Estes são considerados como o método mais confiável e preciso para o desenho experimental devido à efetividade de minimização dos fatores de confusão e à maximização do controle sobre o ambiente de estudo. Estes estudos estão no topo da pirâmide da qualidade da evidência científica e podem, por isso, estabelecer a relação causal mais convincente, quando comparados com outros estudos clínicos, como os de coorte ou caso controle (Faber *et al.*, 2016; Sterne *et al.*, 2011; Sterne e Egger, 2001; Zhu, Ju e Ni, 2015). Esta escolha foi um requisito a considerado de modo a aumentar a robustez da evidência científica desta revisão. Para a avaliação da globalidade dos estudos, quer na revisão sistemática, quer na meta-análise foram escolhidos três parâmetros: a taxa de sucesso, avaliada em cada um dos estudos através de exame clínico e radiográfico; a resposta inflamatória, avaliada apenas em estudos onde foi possível efetuar análise histológica; e a formação de ponte dentinária, avaliada radiograficamente ou, em alguns casos, histologicamente. Estes parâmetros são todos indicadores de sucesso clínico e foram avaliados isoladamente, para se poderem comparar entre biomateriais ou entre técnicas; e em conjunto para se aferir, com robustez, qual o biomaterial com melhor desempenho clínico. No entanto, a avaliação da resposta inflamatória foi realizada de forma diferente na revisão sistemática e na meta-análise. Na revisão sistemática foi avaliado o parâmetro da forma como normalmente é realizado na análise histológica, isto é, pela presença de sinais inflamatórios. Na meta-análise, e como se pretendiam classificar todos os parâmetros no sentido do sucesso clínico das terapêuticas, foi avaliada a ausência de resposta inflamatória, por ser esse o resultado de um bom desempenho clínico.

Em muitos estudos, no entanto, os critérios clínicos são inadequados para uma avaliação a longo prazo do prognóstico das terapêuticas de proteção pulpar direta. Algumas situações clínicas podem evoluir para uma degeneração pulpar e necrose sem que ocorram sinais e sintomas clínicos (Li *et al.*, 2015). Por essa razão foram escolhidos os três parâmetros para serem avaliados simultaneamente.

Os cimentos à base de hidróxido de cálcio foram considerados os materiais *gold standard* durante várias décadas. No entanto, há cerca de 14 anos surgiu outro material biocompatível, um cimento à base de agregados de trióxido minerais, com várias aplicações clínicas como

obturação apical cirúrgica, reparação de perfurações radiculares e de furca, apexog nese, apexificação, pulpotomias e, mais tarde, em proteções pulpar diretas (Chen e Suh, 2017). Para comparar a eficácia e a efetividade destes dois materiais, nestas terap euticas, foi elaborada a primeira revisão sistemática. Foram incluídos nesta revisão estudos RCTs e estudos de coorte. Os resultados da avaliação da taxa de sucesso diferem para os estudos RCTs e para os estudos de coorte, sendo para os cimentos à base de hidróxido de cálcio de 85% e de 62% respetivamente; e para os cimentos à base de MTA de 91% e 83% respetivamente. Estas diferenç as entre os resultados dos estudos são coerentes, embora com ordens de grandeza diferentes. Estas variações, entre os resultados dos estudos de coorte e os estudos RCTs, devem-se ao facto de os tempos de *follow-up* serem maiores para os primeiros, com perdas mais elevadas, assim como ao ambiente de investigação menos controlado. Ainda assim, conclui-se que a taxa de sucesso é maior nas terap euticas com cimentos à base de MTA do que com os cimentos à base de hidróxido de cálcio. Estes resultados têm como base, apenas 3 estudos RCTs e 8 estudos de coorte. No entanto, estas avaliações são corroboradas com os resultados da resposta inflamatória e da formação de ponte dentinária dos restantes estudos clínicos aleatorizados. Nestes estudos, os cimentos à base de hidróxido de cálcio têm respostas inflamatórias intensas em 53% e formação de ponte dentinária em 52%; enquanto que os cimentos à base de agregados de trióxidos minerais têm respostas inflamatórias intensas em 32% e formação de ponte dentinária em 73%.

Este desempenho clínico superior, quer global, quer em cada um dos parâmetros analisados, dos cimentos à base de MTA foi, também, corroborado pela meta-análise efetuada. Nesta avaliação observaram-se diferenç as estatisticamente significativas nos três parâmetros analisados, isto é, na taxa de sucesso ($p < 0,001$), na resposta inflamatória ($p < 0,05$) e na formação de ponte dentinária ($p < 0,01$) entre os cimentos à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de MTA.

Outras revisões sistemáticas e meta-análises concluem, também, que os cimentos de MTA têm taxas de sucesso mais elevadas, resultados de respostas inflamatórias menos intensas e de formação de pontes dentinárias mais previsíveis do que os cimentos à base de hidróxido de cálcio (Chen e Suh, 2017; Li *et al.*, 2015; Rasaratnam, 2016; Rosa, da *et al.*, 2017; Zhu, Ju e Ni,

2015). Outros autores referem que os cimentos à base de MTA estão associados a tempos de indução da formação da barreira apical em dentes imaturos significativamente menores, encurtando os tempos de tratamento (Lin *et al.*, 2016). Ainda assim, mesmo não sendo a maioria, outros autores referem que não existe evidência científica consistente de que os cimentos à base de MTA promovam a formação de uma ponte dentinária mais frequentemente do que os à base de hidróxido de cálcio (Fransson, Wolf e Petersson, 2016; Olsson, Petersson e Rohlin, 2006).

A avaliação da qualidade dos estudos, quer dos estudos RCTs, quer dos estudos de coorte é fundamental para verificar a evidência científica de cada um deles. Alguns dos estudos RCTs falham na descrição da geração de uma sequência aleatória para a escolha dos participantes, quatro deles não apresentam informações suficientes sobre a metodologia e outro não refere qualquer método. Também a ocultação da alocação não foi devidamente explicada em 6 dos estudos. A ausência total de viés de desempenho, com a intervenção cega de doentes e de investigadores, parece difícil de concretizar devido às características muito diferentes dos materiais, apenas se verificando a intervenção cega dos doentes. Em todos os estudos avaliados, a ausência total de viés de desempenho foi, apenas, conseguida em três deles. Esta baixa percentagem também se verificou-se noutras revisões sistemáticas de outros autores (Li *et al.*, 2015; Zhu, Ju e Ni, 2015). Quanto aos outros tipos de viés foram considerados de baixo risco em todos os estudos avaliados. Na qualidade dos estudos de coorte foi obtida uma classificação de razoável a boa em todos os estudos. Nos itens metodológicos com resultados piores estão as perdas no *follow-up*, que foram muito elevadas em todos os estudos e o cálculo prospetivo da amostra, que não foi efetuado em nenhum deles. Estas são lacunas importantes na maioria dos estudos de coorte, mas que devem ser valorizados e corrigidos de modo a aumentar a robustez da evidência científica dada por este tipo de estudos.

Corroborando a sua indicação como *gold standard*, e através da revisão sistemática e da meta-análise efetuadas no presente estudo, recomenda-se a utilização dos cimentos de agregados trióxidos minerais em terapêuticas de proteção pulpar direta, em detrimento dos cimentos de hidróxido de cálcio.

Como já referido, os cimentos à base de agregado de trióxidos minerais são bioativos, biocompatíveis, antibacterianos e têm boa estabilidade e capacidade de selagem. No entanto, o

longo tempo de presa, as fracas propriedades de manipulação, o elevado custo e o seu potencial de descoloração, tornam-no um material com inúmeras desvantagens clínicas (Hegde *et al.*, 2017). Os cimentos à base de silicatos tricálcico têm vindo a ser utilizados nestas terapêuticas por apresentarem vantagens clínicas relativamente aos cimentos à base de MTA. Esta revisão sistemática foi efetuada tendo como objetivo avaliar o desempenho clínico destes dois biomateriais, pesquisando diferenças entre eles. Por esta razão, apenas foram incluídos estudos que comparam os dois materiais, uma vez que, por terem características tão semelhantes, os resultados com outros materiais seriam expectáveis. Por exemplo, em alguns estudos que comparam os cimentos à base de hidróxido de cálcio e cimentos à base de silicatos tricálcico conclui-se que os segundos são clinicamente superiores aos primeiros (Gandolfi *et al.*, 2015; Grewal *et al.*, 2016; Jalan, Warhadpande e Dakshindas, 2017). A avaliação dos três parâmetros demonstrou o que já foi referido, isto é, que os cimentos à base de silicatos tricálcico e os cimentos à base de MTA têm desempenhos clínicos muito semelhantes. A revisão sistemática conclui que os cimentos à base de silicatos tricálcicos apresentam uma resposta inflamatória intensa menor e a formação de uma ponte dentinária superior relativamente aos cimentos à base de MTA, mas na avaliação da taxa de sucesso verifica-se o inverso. Estas conclusões refletem, também, o que está descrito na literatura, com estudos que apresentam resultados semelhantes para os dois biomateriais (Brizuela *et al.*, 2017; Katge e Patil, 2017; Prati e Gandolfi, 2015). No entanto, refere-se que mais estudos serão necessários, uma vez que o tempo de avaliação clínica dos cimentos à base de silicatos tricálcico é reduzido, não sendo ainda possível avaliá-lo em estudos de coorte. A análise quantitativa efetuada corroborando o que foi referido, concluiu que não existem diferenças estatisticamente significativas, nos vários parâmetros analisados, entre os dois biomateriais. A avaliação da qualidade dos estudos é positiva em três tipos de viés: o de atrito, o de relatório e outros vieses. No entanto, embora tenham sido incluídos apenas estudos aleatorizados, o viés de seleção apenas é de baixo risco para três estudos, e o viés de deteção é de baixo risco para dois estudos. Tal como se verifica nas outras revisões sistemáticas, o viés de desempenho é de alto risco em todos os estudos, uma vez que apenas se verifica a intervenção cega dos doentes e não dos investigadores, devido às características de manipulação dos materiais.

A utilização dos cimentos à base de silicatos tricálcico é recomendada, tendo em conta os resultados das avaliações efetuadas através da revisão sistemática e meta-análise. No entanto, devem ser efetuados mais estudos, especialmente de coorte, para avaliar a sua efetividade a longo prazo.

Alguns estudos demonstraram que, exposições pulpares iatrogénicas tratadas através de uma terapêutica de proteção pulpar direta mostravam sinais de infeção e de necrose devido à microinfiltração dos materiais utilizados e defeitos em túnel nas pontes dentinárias formadas (Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000). Foi observado, também, que o contacto direto do tecido pulpar com outros materiais restauradores, nomeadamente as resinas compostas e o amálgama, não irritavam de forma permanente as polpas saudáveis e preveniam a infiltração bacteriana (Kitasako, Inokoshi e Tagami, 1999). Foi, então, sugerido a proteção pulpar direta de tecido exposto com sistemas adesivos e resinas compostas (Demarco *et al.*, 2001; Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000). A utilização destes materiais em proteções pulpares diretas tem sido, ao longo dos anos, controverso. Alguns autores referem a formação de uma ponte dentinária parcial (Hebling, Giro e Costa, 1999; Hörsted-Bindslev, Vilkinis e Sidlauskas, 2003; Nowicka *et al.*, 2016), mas outros concluem que há formação de uma barreira mineralizada apenas ao fim de 90 dias (Elias *et al.*, 2007). A maioria dos estudos refere que os sistemas adesivos apresentam resultados inferiores aos cimentos à base de hidróxido de cálcio (Crane, 2006; Parthasarathy *et al.*, 2016), e ainda outros contraindicam mesmo a sua utilização nestas terapêuticas (Accorinte *et al.*, 2006, 2008, 2005; Lu *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2006). A revisão sistemática do nosso estudo reflete esta controvérsia da literatura. A taxa de sucesso positiva e a presença de resposta inflamatória têm uma variação de mais de 80%, o que demonstra metodologias disparees quer dos desenhos de estudo, quer da avaliação dos resultados. Deste modo, este parâmetro não foi avaliado quantitativamente devido à escassa informação, referida nos estudos, relativamente aos critérios analisados para a obtenção destas taxas de sucesso. Quanto à formação de uma ponte dentinária, nenhum estudo da revisão sistemática refere a sua edificação completa. A avaliação quantitativa da meta-análise confirma estas referências, demonstrando um aumento significativo, em todos os parâmetros analisados ($p < 0,001$) do desempenho clínico dos cimentos à base de hidróxido de cálcio relativamente aos sistemas

adesivos. Relativamente à avaliação da qualidade dos estudos, tal como na avaliação das revisões sistemáticas anteriores, as maiores falhas dos estudos RCTs estão na descrição da geração de uma sequência aleatória para a escolha dos participantes, sendo que apenas dois estudos o fazem corretamente. Também a ocultação da alocação não foi devidamente explicada em 6 dos estudos. A ausência total de viés de desempenho, com a intervenção cega de doentes e de investigadores, parece difícil de concretizar devido às características muito diferentes dos materiais, apenas se concretizando a intervenção cega dos doentes. De todos os estudos avaliados, a ausência total de viés de desempenho foi, apenas, conseguida em um deles. Quanto aos outros tipos de vieses foram considerados de baixo risco em todos os estudos avaliados, com exceção para a avaliação cega de resultados que não foi devidamente explicada em dois deles.

Após esta avaliação qualitativa e quantitativa, podemos concluir que este tipo de material pode exercer um dano potencial no tecido pulpar através do condicionamento ácido, da toxicidade dos seus componentes, da microinfiltração por contração de polimerização, da desmineralização da dentina por penetração incompleta da resina fluida, de sensibilidade aumentada por sensibilização aos seus componentes, e aumento da temperatura durante a polimerização (Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000). A separação dos efeitos destes fatores é difícil e o sinergismo dos mesmos é possível, o que nos leva a recomendar a não utilização destes materiais nas terapêuticas de proteção pulpar direta.

A avaliação do risco de enviesamento dos estudos das meta-análises foi efetuada através da elaboração dos *funel plots*. Verificou-se que não existia viés de publicação para a meta-análise que comparou os cimentos à base de silicato tricálcico e MTA, uma vez que todos os estudos eram estudos RCTs. Por outro lado, a meta-análise que comparou os cimentos à base de hidróxido de cálcio e MTA, embora se tenha obtido um gráfico de dispersão muito simétrico, dois dos estudos estão fora do gráfico. Este facto pode ser explicado devido à inclusão simultânea, nesta meta-análise, de estudos de coorte, isto é, não aleatorizados de intervenção e de estudos RCTs. Alguns autores sugerem que uma forma de diminuir este viés, seria explicar adequadamente a pesquisa na literatura cinzenta, descrever de forma rigorosa os estudos não

aleatorizados de intervenção, elaborar uma avaliação do risco de viés de confusão e indicar se as estimativas brutas ou ajustadas foram combinadas (Faber *et al.*, 2016).

No entanto, a meta-análise que compara os sistemas adesivos e os cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentou um viés de publicação, devido à inclusão de estudos com amostras muito pequenas.

A forma mais fácil de diminuir o risco de viés de publicação seria obter os dados de todos os estudos publicados e não publicados, pesquisando na designada literatura cinzenta. Este problema só pode ser contornado quando houver uma obrigatoriedade para o registo de todos os ensaios clínicos e se estabelecerem regras para o mesmo (Li *et al.*, 2015).

Para que a evidência seja melhorada, os estudos clínicos aleatorizados deveriam ter amostras suficientemente grandes para detetarem diferenças nos efeitos das terapêuticas. O tamanho da amostra deveria, preferencialmente, ser calculado antes do início do ensaio baseado na diferença de efeito antecipado que tenha significado clínico (Olsson, Petersson e Rohlin, 2006). Por exemplo, para se conseguir detetar uma espectável, mas pequena diferença, como entre os cimentos à base de MTA e os à base de silicatos tricálcico, seria necessária uma amostra maior. Seria, também, essencial a utilização de um grupo controlo, preferencialmente com um material com larga experiência como o cimento à base de hidróxido de cálcio.

Idealmente deveriam ser incluídos nas meta-análises estudos aleatorizados e não aleatorizados. Os estudos RCTs são considerados os estudos *gold standard* da medicina baseada na evidência porque são desenhados para minimizar o risco de viés. No entanto, a aplicabilidade dos seus resultados tem sido criticada por alguns autores, uma vez que os critérios de seleção são muito restritivos, excluindo normalmente doentes adultos e com morbilidades ou doenças severas (Faber *et al.*, 2016). Algumas dessas questões serão discutidas no estudo clínico do nosso estudo.

Por outro lado, os estudos não aleatorizados como os estudos de coorte prospetivos, retrospectivos, casos controlo e casos de séries, refletem melhor o que ocorre na prática clínica, uma vez que abrangem uma faixa mais ampla de participantes com tempos de *follow up* mais alargados (Faber *et al.*, 2016). A conjugação dos resultados destes dois tipos de estudos,

umentaria a robustez das meta-análises e, conseqüentemente, as conclusões retiradas teriam maior impacto na prática clínica (Sterne *et al.*, 2011; Sterne e Egger, 2001).

A revisão sistemática de outros materiais e técnicas, que estão descritos na literatura como sendo aplicáveis nas terapêuticas de proteção pulpar direta, teve como objetivo avaliar a sua real efetividade e eficácia. Devido à discrepância de avaliações, aos materiais controlo sempre diferentes e ao elevado número de materiais e técnicas, não foi possível realizar uma análise quantitativa. A análise qualitativa foi efetuada, mas com as limitações já descritas. Para o parâmetro da taxa de sucesso, apenas foi possível avaliar a técnica que utiliza a luz *laser*, com taxas de sucesso relativamente elevadas, cerca de 88%. Outros estudos de revisão com meta-análise corroboram estes resultados e sugerem a utilização de luz *laser* nas terapêuticas de proteção pulpar direta. No entanto, não é possível identificar a real contribuição do laser na taxa de sucesso destas terapêuticas, porque o tipo de materiais utilizados concomitantemente à utilização do *laser*, são, na sua maioria, biomateriais com bons resultados clínicos, como os cimentos à base de hidróxido de cálcio e MTA (Deng *et al.*, 2016; Javed *et al.*, 2017).

Quanto à presença de resposta inflamatória, ela foi muito elevada para os materiais avaliados neste parâmetro, quando comparados com os seus respetivos controlos, que embora diferentes entre estudos, eram sempre os cimentos à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de MTA. Assim, tanto para a hidroxiapatite, como para as proteínas morfogenéticas do esmalte e para as formulações magistrais com antibióticos e corticoides as respostas inflamatórias eram muito elevadas, entre 45% a 100%. Concomitantemente, nestes materiais a formação da ponte dentinária apresenta valores muito baixos e muito variáveis, como o caso da hidroxiapatite com valores entre 0% a 80%, quando comparados com o controlo. As proteínas morfogenéticas não apresentavam qualquer formação de ponte dentinária, assim como as formulações magistrais que a apresentavam em 10% dos casos. Alguns estudos referem as proteínas morfogenéticas do esmalte como sendo materiais promissores em estudos animais, embora com fracos resultados em termos clínicos (Al-Hezaimi *et al.*, 2013). Estas conclusões corroboram as apresentadas na revisão sistemática do presente estudo, onde dois dos estudos apresentam respostas inflamatórias intensas em 50% a 100% dos casos e formação de ponte dentinária em 0% dos casos. Os estudos que avaliam a hidroxiapatite têm

resultados completamente dispare, com formação de ponte dentinária de 80% num estudo e 0% noutra. Outros estudos demonstram a ausência total de formação de ponte dentinária (Danesh *et al.*, 2012). Outros ainda, em animais, recomendam a não utilização destes materiais em proteções pulpares diretas, uma vez induzem calcificações distróficas da polpa dentária (Jaber, Mascrès e Donohue, 1991) ou necrose pulpar (Heling, Zalkind e Sela, 1989). Assim, recomenda-se a não utilização destes materiais para a realização destas terapêuticas, sem que haja mais estudos que comprovem a sua eficácia.

Os resultados das terapêuticas de proteção pulpar direta, com a utilização de técnicas *laser* coadjuvadas com a utilização de um biomaterial, são positivos e a sua utilização clínica pode melhorar o prognóstico destas terapêuticas.

Por outro lado, os resultados de outros materiais, como a hidroxiapatite, as proteínas morfogenéticas do esmalte e as formulações magistrais com antibióticos e corticoides sugerem que a sua utilização esteja contraindicada para as terapêuticas de proteção pulpar direta.

Outros biomateriais tem sido estudados, ainda que em estudos preliminares com animais, mas com resultados promissores, nomeadamente as proteínas BMP-7, o TGF- β 1 e os extratos solúveis de proteínas da matriz dentinária (Wellington *et al.*, 2017).

CAPÍTULO VIII — ESTUDO CLÍNICO

O presente estudo clínico preliminar retrospectivo pretende abordar os fatores de sucesso/insucesso clínico após o tratamento de uma exposição pulpar direta com WhiteProRoot®MTA ou com Biodentine™. Incluíram-se na avaliação destes fatores, a avaliação clínica da ausência ou da presença de sintomatologia compatível com estados pulpares inflamatórios e a avaliação radiográfica das alterações estruturais da restauração coronária que suporta a reparação dos tecidos pulpares e as alterações do próprio tecido pulpar. Em termos globais, pretendeu-se avaliar a vantagem da utilização clínica do Biodentine™ quando comparado com outro material semelhante, como o WhiteProRoot®MTA, pesquisando sinais clínicos de preservação da vitalidade do tecido pulpar nos doentes tratados com este material. O estudo clínico retrospectivo compreendeu tratamentos comuns à prática clínica de rotina. De acordo com este pressuposto requereu-se à comissão de ética da FMUC/CHUC o consentimento para a implementação deste estudo clínico retrospectivo, o qual foi aprovado (anexo III).

Material e Métodos

Seleção da amostra

Foram avaliados os processos clínicos de doentes entre os anos 2012 e 2016, que realizaram terapêuticas de proteção pulpar diretas na consulta de Dentisteria Operatória do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal. Foram incluídos, apenas, doentes nos quais tinham sido realizadas proteções pulpares diretas com dois materiais indutores da dentinogénese, um agregado trióxido mineral, o WhiteProRoot®MTA atualmente considerado o

Gold Standard e um silicato de tricálcico, o Biodentine™. A amostra pretendeu ser uniformizada quanto ao número de casos clínicos para cada um dos biomateriais.

Critérios de inclusão

Os doentes incluídos obedeceram a determinados critérios que se encontravam relatados no processo clínico, e que são expostos de seguida. Relativamente aos critérios clínicos aquando do diagnóstico, incluíram-se aqueles que apresentavam testes de sensibilidade térmicos compatíveis com diagnóstico de dente vital e exame radiográfico corroborante. Relativamente à idade e ao estado de saúde oral, incluíram-se doentes com idades compreendidas entre os 18 e os 55 anos e com um razoável estado de saúde e higiene oral, sem patologia periodontal.

As terapêuticas de proteção pulpar incluídas obedeceram a condições clínicas consistentes e estandardizadas, nomeadamente relativamente ao tipo de isolamento, à desinfeção cavitária efetuada, e aos materiais utilizados para restauração da estrutura dentária remanescente. Assim, foram incluídas terapêuticas em que foi realizado isolamento absoluto com dique de borracha ou isolamento relativo, e em que a desinfeção cavitária foi realizada com clorhexidina a 2%. Foram incluídos dentes cujas restaurações foram realizadas com recurso a sistemas adesivos com condicionamento ácido total (do inglês *total-etch adhesive*) ou sistemas adesivos autocondicionantes com condicionamento ácido seletivo no esmalte (do inglês *self-etch adhesive*). Os materiais de restauração utilizados em todas as terapêuticas foram resinas compostas fotopolimerizáveis.

Avaliação dos procedimentos clínicos das terapêuticas de proteção pulpar diretas

Tendo em conta os critérios de inclusão descritos, foram incluídas 21 proteções pulpares diretas realizadas em 20 doentes, divididos em dois grupos, um com 11 dentes tratados com WhiteProRoot® MTA e outro com 10 dentes tratados com Biodentine™. As etiologias das exposições pulpares foram diferentes, nomeadamente por lesão cáriosa extensa e por causas iatrogénicas existindo, por isso, diferentes dimensões do local de exposição. Alguns processos

clínicos referiam, ainda, a necessidade de terem sido efetuadas proteções pulpares antes da remoção completa da lesão de cárie ativa. Em todos os doentes selecionados as terapêuticas foram efetuadas com um dos biomateriais, seguido da colocação de uma base de um cimento de ionómero de vidro modificado por resina. As restaurações definitivas foram efetuadas na consulta em que se realizou a proteção pulpar direta ou, nalguns casos por condicionalismos vários, foram realizadas nos 15 dias seguintes. No final de cada terapêutica foi relatada a realização de avaliação radiográfica. Todos estes procedimentos clínicos estão contemplados nas normas das boas práticas clínicas (Kravitz, Bullock e Cowpe, 2015).

Avaliação dos casos clínicos após a terapêutica

Foram escrutinados os controlos clínicos que se efetuaram-se na 1ª semana, no 1ª mês, no 3º mês e no 6º mês após as terapêuticas. Não foi possível obter *follow ups* mais alargados por não haver registo nos processos clínicos de outras avaliações após os 6 meses. Nestes controlos tinham sido realizados testes qualitativos como o teste de sensibilidade pulpar, que incluiu o teste ao frio com cloreto de etilo e o teste de percussão vertical e horizontal. Os resultados obtidos na avaliação qualitativa basearam-se em critérios clínicos já estabelecidos nas boas práticas e são descritos na Tabela 12.

Nos controlos clínicos, ao longo do tempo, foi possível efetuar a avaliação do estado da restauração, nomeadamente a pesquisa de fraturas e/ou infiltração marginal, através dos exames complementares que constavam nos processos clínicos. O exame complementar realizado em todos os casos clínicos incluídos foi a radiografia periapical. Este exame complementar permitiu, ainda, a avaliação de sinais secundários de insucesso da terapêutica efetuada, nomeadamente a formação de lesão radicular apical e o aparecimento de cárie secundária. As terapêuticas em dentes que permaneceram assintomáticos, com testes de sensibilidade com o cloreto de etilo normais e sem sinais radiográficos de patologia periapical, foram consideradas como sucessos clínicos.

Tabela 12: Critérios de avaliação qualitativa para os testes de sensibilidade pulpar

Tipo de teste	Estado normal do tecido pulpar	Estado patológico do tecido pulpar		
		Pulpite reversível	Pulpite irreversível	Necrose
Teste com cloreto de etilo	Positivo (sem alteração da intensidade ou duração após o estímulo)	Positivo (com alteração da intensidade e/ou duração após o estímulo inferior 5 segundos)	Positivo (com alteração da intensidade e/ou duração após o estímulo superior 5 segundos)	Negativo
Teste de percussão horizontal	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Teste de percussão vertical	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

Análise estatística

O fator idade avaliou-se através de uma análise descritiva e da aplicação de testes de normalidade, como o teste de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk. Para realizar as comparações dos biomateriais utilizados nas terapêuticas e das características das exposições pulpares, nomeadamente a etiologia e a dimensão, utilizaram-se o teste do Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher de acordo com as regras de Cochran. Para a avaliação das variáveis que caracterizam a sintomatologia ao longo do tempo realizou-se uma análise de frequência.

Resultados

Os aspetos da história clínica que foram tidos em conta podem ser observados na Figura 50.

O presente estudo clínico incluiu doentes com idades entre os 18 e os 55 anos, em maior número na faixa etária dos 18 aos 25 anos, numa percentagem de 45%. A faixa etária dos 46

aos 55 anos foi a segunda mais elevada, com uma percentagem de 30%. A média de idade foi de $32,2 \pm 13,85$ anos, com uma distribuição não normal, uma mediana de 26 e amplitude inter-quartil (AiQ) de 28.

Em relação ao tipo de dentes com a terapêutica de proteção pulpar, a distribuição foi uniforme com uma maior percentagem de molares, cerca de 42,9%, seguida do grupo dos incisivos e dos caninos com cerca de 33,3% e, por fim, dos pré-molares com cerca de 23,8%.

Os hábitos de higiene no universo dos doentes que foram incluídos no estudo revelaram-se maioritariamente razoáveis e bons, na percentagem de 42,9% em ambos os grupos. Apenas uma pequena percentagem, de cerca de 14,3% foi referenciada como tendo maus hábitos de higiene.

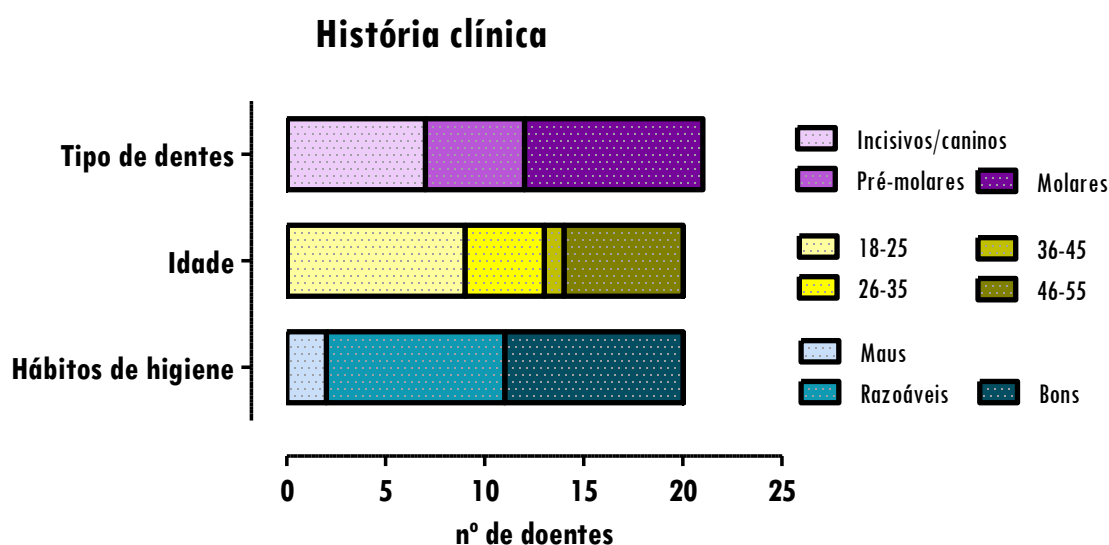


Figura 50: Aspectos relevantes da história clínica dos doentes que integraram o estudo clínico, nomeadamente idade, hábitos de higiene e tipo de dentes intervencionados. Os resultados correspondem a 20 doentes, nos quais foram efetuadas terapêuticas de proteção pulpar em 21 dentes.

Os diversos tipos de materiais, quer os biomateriais utilizados na proteção do tecido pulpar, quer os materiais adesivos e restauradores utilizados na fase restauradora, podem ser observados na Figura 51.

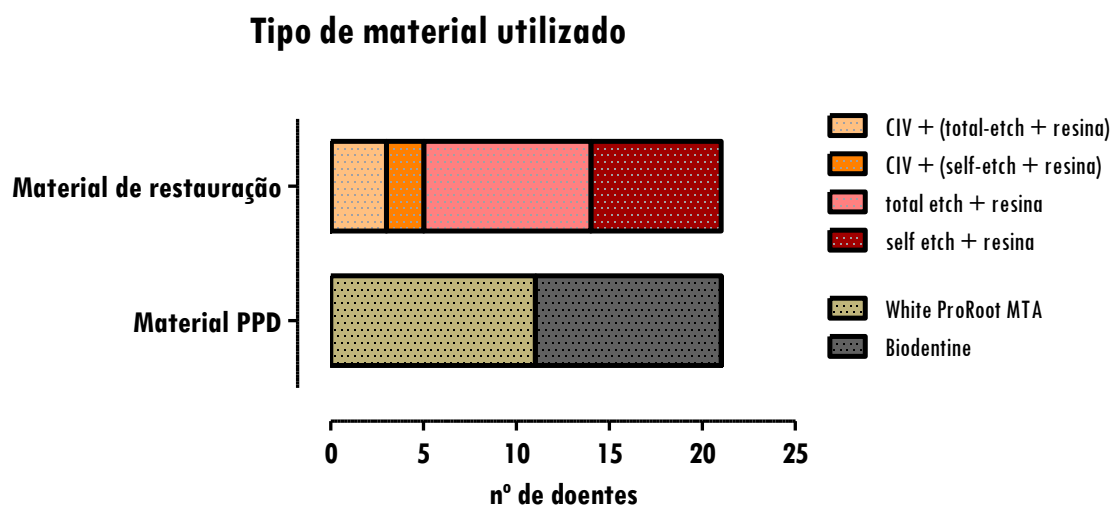


Figura 51: Tipos de material utilizado para a proteção pulpar direta e para a restauração da estrutura dentária. Os resultados são de 21 dentes, nos quais foram efetuadas terapêuticas de proteção pulpar.

No presente estudo clínico retrospectivo avaliaram-se casos clínicos em que foram utilizados dois tipos de biomateriais para realizar as proteções do tecido pulpar. Em 52,4% dos dentes utilizou-se o WhiteProRoot[®]MTA e em 47,6% o Biodentine[™]. Relativamente aos materiais de restauração, cerca de 23,8% dos dentes foram restaurados, numa fase inicial, provisoriamente com um cimento de ionómero de vidro e cerca de 76,2% foram restaurados definitivamente. Na restauração definitiva de todos os dentes submetidos à terapêutica de proteção pulpar, em 57,2% foi utilizado um sistema de adesão dentinária do tipo *total-etch*, e em 42,8% um sistema de adesão dentinária do tipo *self-etch*. As restaurações definitivas realizaram-se com resinas compostas, como já foi referido.

Os fatores de diagnóstico relevantes pré-terapêutica e aqueles que ocorreram durante a terapêutica e que se mostraram importantes para o prognóstico registaram-se igualmente, como se pode observar na Figura 52.

Relativamente aos fatores de diagnóstico pré-terapêutica, cerca de 85,7%, dos dentes intervencionados teve como causa da exposição pulpar a cárie dentária. Por outro lado, em cerca de 14,3% a exposição pulpar foi realizada de forma iatrogénica.

Estado clínico dentário para terapêutica

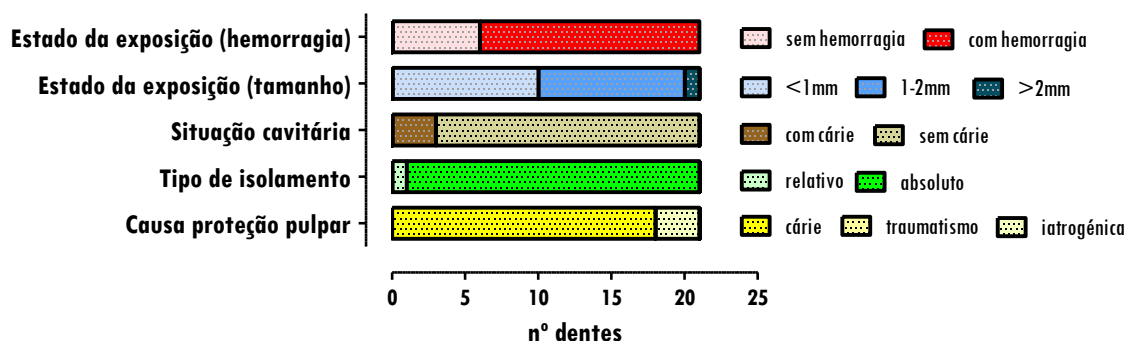


Figura 52: Fatores de diagnóstico do estado clínico pré-terapêutica, como a causa da proteção pulpar e o tipo de isolamento efetuado e fatores clínicos revelantes para o prognóstico, como o estado cavitário e o estado da exposição pulpar (tamanho e hemorragia). Os resultados correspondem a 21 dentes, nos quais foram efetuadas terapêuticas de proteção pulpar.

Não se escrutinou nenhuma exposição pulpar por traumatismo dentário. Nas terapêuticas instituídas nos 21 dentes, cerca de 95,2% foram efetuadas sob isolamento com dique de borracha, tendo sido utilizado, nas restantes, isolamento relativo com rolos de algodão. Em cerca de 14,3% das terapêuticas foi referido que existia dentina cariada no momento da exposição pulpar. Relativamente à exposição pulpar, em cerca de 47,6% o seu tamanho foi menor que 1mm. Foram referidas exposições pulpares de tamanho médio de 1 a 2 mm, em cerca de 47,6% dos dentes. Em cerca de 4,8% dos dentes foram relatadas exposições com dimensões maiores do que 2mm. Em 71,4% das situações clínicas foram relatadas ocorrências de hemorragia e em 28,6% das exposições pulpares não foi mencionada a ocorrência de hemorragia.

Como referido, extraíram-se os dados da avaliação clínica inicial em todos os dentes intervencionados de modo a confirmar o diagnóstico de dente vital ou com pulpíte reversível, compatível com o tipo de terapêutica de proteção pulpar direta instituída. Estes dados da avaliação inicial estão descritos na Figura 53.

Assim, em todos os dentes submetidos à terapêutica, os testes de percussão horizontal e vertical relatados foram negativos. O teste de sensibilidade com o cloreto de etilo revelou uma

resposta normal em 95,2% dos dentes e ligeiramente aumentado, isto é, compatível com dente em pulpite reversível, em 4,8% dos dentes.

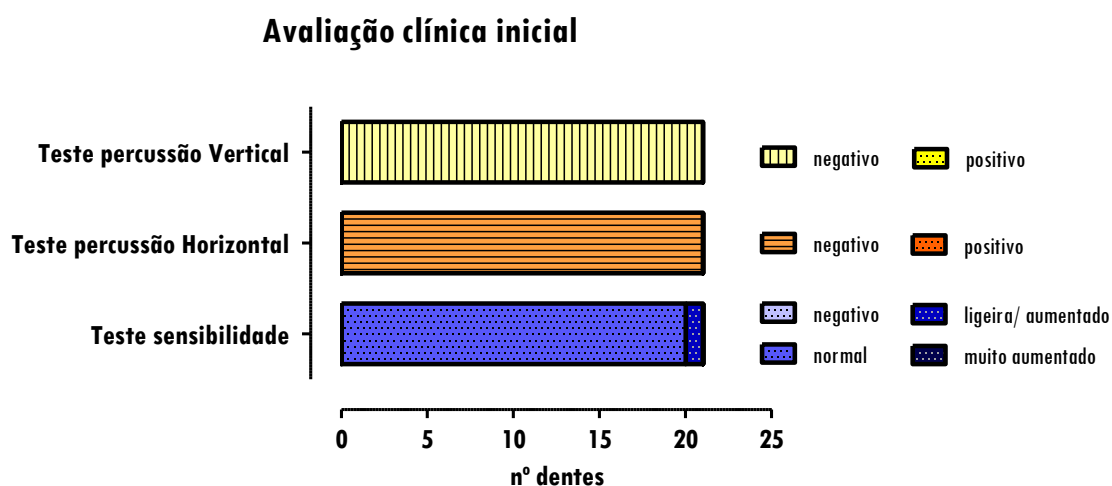


Figura 53: Avaliação clínica pré-terapêutica, avaliação de alterações aos testes de sensibilidade ao frio e à percussão horizontal e vertical. Os resultados correspondem a 21 dentes, nos quais foram efetuadas terapêuticas de proteção pulpar.

Foram registadas as avaliações que se realizaram à 1ª semana, ao 1º mês, aos 3 meses e aos 6 meses, tendo em conta os diversos parâmetros para aferir o estado pulpar dos dentes intervencionados com a terapêutica de proteção pulpar. Em todos os controlos foi efetuada uma avaliação radiográfica, que contribuiu para a avaliação de alguns parâmetros referidos. Na Figura 54 podem ser observadas radiografias periapicais, a título de exemplo, de dois casos clínicos em que foram efetuadas proteções pulpares com biomateriais diferentes.

A avaliação realizada nos controlos após a terapêutica teve em conta cinco parâmetros e os resultados podem ser observados na Figura 55.

Nas avaliações realizadas no controlo da 1ª semana, o teste de sensibilidade revelou-se normal em 71,4% dos dentes e ligeiramente aumentado em 28,6% dos dentes. No teste de percussão horizontal foi relatado que 95,2% dos dentes respondia negativamente e 4,8% positivamente.

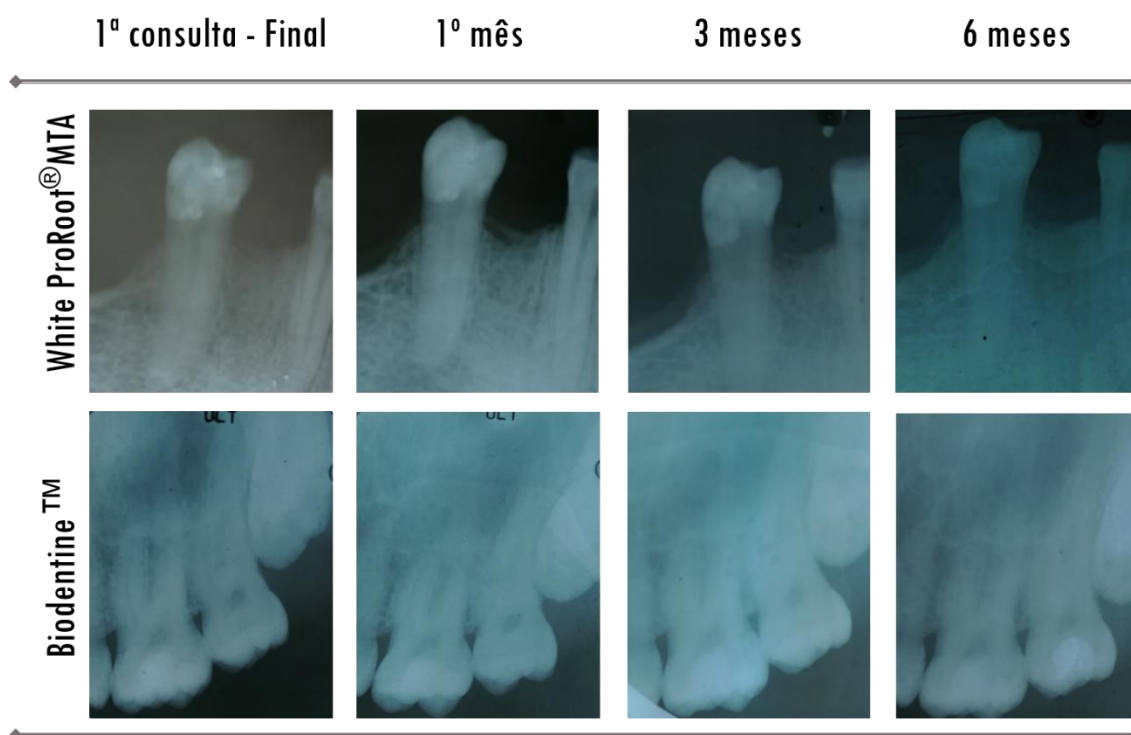


Figura 54: Painel de imagens radiográficas correspondentes a terapêuticas de proteção pulpar direta com os biomateriais WhiteProRoot® MTA e Biodentine™. A terapêutica com o WhiteProRoot® MTA foi efetuada no dente 35, com exposição pulpar de causa iatrogênica <2mm, com hemorragia e sob isolamento absoluto. A restauração definitiva foi efetuada após a terapêutica na mesma consulta, com um adesivo *total-etch* (Scotchbond 1®) e resina composta (Synergy D6®). A terapêutica com o Biodentine™ foi efetuada no dente 26, com uma exposição pulpar devido a lesão cáriosa entre 1 a 2mm, sem hemorragia e sob isolamento absoluto, restaurado definitivamente após a terapêutica com um adesivo *total-etch* (Scotchbond 1®) e resina composta (Synergy D6®).

Quanto ao teste de percussão vertical foi relatado que 90,5% dos dentes apresentou respostas negativas e 9,5% respostas positivas. A avaliação radiográfica coronária e a avaliação radiográfica radicular revelaram que 100% dos dentes intervencionados não apresentava sinais de cárie secundária, nem quaisquer sinais de lesão dos tecidos apicais. Foram relatadas novas avaliações dos diversos parâmetros decorrido 1 mês da terapêutica de proteção pulpar, como se pode observar na figura 48. O teste de sensibilidade revelou-se normal em 65% dos dentes, ligeiramente aumentado em 30% e muito aumentado em 5% dos dentes. Por outro lado, em todos os submetidos à terapêutica, os testes de percussão horizontal e vertical revelaram-se negativos.

INDUTORES DA DENTINOGÊNESE EM PROTEÇÕES PULPARES DIRETAS

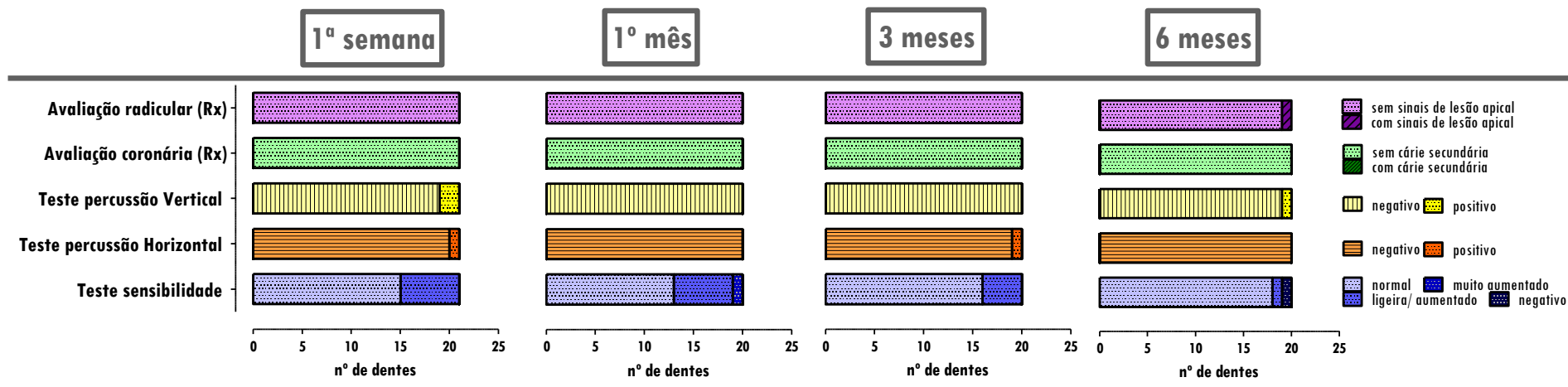


Figura 55: Tempos de controlo das terapêuticas. Pesquisa de alterações em cinco parâmetros: testes de sensibilidade ao frio (negativo, normal, ligeiramente aumentado e muito aumentado); testes de percussão horizontal e vertical (negativo e positivo); radiografia coronária (com ou sem cárie secundária); radiografia radicular (com ou sem lesão apical). Os resultados são de 21 dentes nos quais foram efetuadas terapêuticas de proteção pulpar para a avaliação na 1ª semana e, de 20 dentes para as avaliações ao 1º mês, aos 3 meses e aos 6 meses.

A avaliação radiográfica coronária e a avaliação radiográfica radicular revelaram que 100% dos dentes intervencionados não apresentava sinais de cárie secundária, nem quaisquer sinais de lesão dos tecidos apicais.

Os parâmetros avaliados aos 3 meses após a terapêutica e que foram relatados, estão igualmente, descritos na figura 48. Na avaliação que se efetuou aos 3 meses, a percentagem de dentes com o teste de sensibilidade normal aumentou para 80%. Um ligeiro aumento da sensibilidade revelou-se em cerca de 20% dos dentes. Os testes de percussão vertical relatados revelaram-se negativos em 100% dos dentes, ao contrário do que ocorreu com o teste de percussão horizontal, que se revelou positivo em 5% dos mesmos. Tal como na avaliação dos controlos na 1ª semana e no 1º mês, os exames complementares radiográficos revelaram que 100% dos dentes intervencionados não apresentava sinais de cárie secundária, nem quaisquer sinais de lesão dos tecidos apicais.

A avaliação pós-terapêutica relatada aos 6 meses revelou algumas alterações relativamente aos outros controlos, como se pode observar na figura 48. Assim, foi diagnosticado necrose pulpar num dente (5%), e um aumento acentuado da sensibilidade noutra (5%). O teste de sensibilidade revelou-se normal para 90% dos dentes avaliados. Corroborando a avaliação dos testes de sensibilidades, o teste de percussão vertical foi positivo num dente (5%), revelando-se negativo para os restantes 95% dos dentes. O teste de percussão horizontal apresentou-se negativo em 100% dos dentes. A avaliação radiográfica, quer a nível coronário quer a nível radicular, manteve-se com resultados negativos em relação ao aparecimento de cárie secundária e, apenas com sinais de lesão dos tecidos periapicais num dente (5%).

Além desta análise descritiva, foram também realizadas comparações entre os resultados obtidos. Assim, realizaram-se comparações entre as situações clínicas apresentadas antes da terapêutica e os resultados obtidos pós-terapêutica.

Alguns dados relativos aos doentes, nomeadamente a idade, foram comparados com os resultados dos testes de sensibilidade ao longo do tempo e, os hábitos de higiene foram comparados com os resultados da avaliação radiográfica da restauração coronária ao longo do tempo. Estas comparações não demonstraram diferenças estatisticamente significativas.

Foram, também, efetuadas comparações entre as circunstâncias da exposição do tecido pulpar (cárie ou iatrogénica), a situação cavitária no momento da exposição (com ou sem cárie) e do tamanho da exposição, com os resultados dos testes de sensibilidade ao longo do tempo. Destas comparações concluiu-se não haver diferenças significativas entre as várias circunstâncias e os resultados destes testes.

Por fim, efetuaram-se também, comparações entre os dois biomateriais estudados e os resultados dos testes de sensibilidade com o cloreto de etilo e a percussão horizontal e vertical e, a avaliação radiográfica radicular. Concluiu-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre os biomateriais e os resultados obtidos após a terapêutica.

Os dois biomateriais apresentaram taxas de sucesso semelhantes aos 6 meses, isto é, de 100% para o WhiteProRoot®MTA e de 95% para o Biodentine™. Neste último grupo verificou-se uma situação clínica de necrose.

Discussão

As terapêuticas de proteção pulpar têm como principal objetivo a manutenção da vitalidade do dente cujo tecido pulpar foi exposto devido a traumatismos, lesões cariosas ou procedimentos restauradores. As opções de tratamento nesta situação, passam pela proteção pulpar direta, a pulpotomia ou a pulpetomia (Hegde *et al.*, 2017; Linu *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, as terapêuticas de proteção pulpar direta eram efetuadas em dentes permanentes jovens com exposições pulpares iatrogénicas ou por traumatismo. Quando as exposições pulpares ocorriam após a remoção de tecido cariado, na maioria das situações, era recomendado efetuar pulpotomias ou até mesmo pulpetomias. As proteções pulpar diretas eram restritas a casos muito específicos com indicações muito restritas. Muitos materiais foram utilizados para este tipo de terapêuticas, como descrito anteriormente na revisão sistemática. Embora o cimento à base de hidróxido de cálcio tenha sido o material de eleição durante muitos anos, este apresentava algumas desvantagens, como já foi largamente referido: fraca aderência

à dentina, dissolução ao longo do tempo e os múltiplos defeitos em túnel das pontes dentinárias (Hegde *et al.*, 2017). As suas taxas de sucesso variavam entre 30% e 85% (Auschill *et al.*, 2003; Barthel *et al.*, 2000; Hörsted-Bindslev, Vilkinis e Sidlauskas, 2003). Com o desenvolvimento de outros biomateriais surgiram os cimentos à base de agregado de trióxidos minerais com taxas de sucesso superiores, com formação de pontes dentinárias estruturalmente mais consistentes e com um efeito antibacteriano elevado, sendo atualmente considerados como os materiais *gold standard* para este tipo de terapêuticas (Accorinte *et al.*, 2008; Hegde *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016; Kundzina *et al.*, 2017). No entanto, os cimentos à base de MTA apresentam grandes dificuldades de manipulação clínica, elevado custo e longos tempos de presa (Hegde *et al.*, 2017; Martens, Rajasekharan e Cauwels, 2015). O aparecimento de novos materiais biocerâmicos, com propriedades semelhantes aos cimentos à base de MTA e com características de manipulação melhoradas, sugere a possibilidade de uma alternativa clínica (Kim *et al.*, 2016; Koubi *et al.*, 2013; Martens, Rajasekharan e Cauwels, 2015; Rajasekharan *et al.*, 2014).

O presente estudo clínico retrospectivo preliminar contribuiu para o conhecimento do desempenho clínico destes biomateriais, nomeadamente o Biodentine™, comparando-o com um *gold standard*, o WhiteProRoot® MTA, considerado neste estudo comparativo, o grupo controlo.

Neste estudo procurou-se aplicar, sempre que possível e com rigor, os itens metodológicos para estudos não aleatorizados, versão MINORS, por forma a aumentar a reprodutibilidade e a qualidade do mesmo. A inclusão dos doentes no estudo ocorreu consecutivamente a partir de uma consulta externa de Dentisteria Operatória e sempre que, na pesquisa dos processos clínicos, se verificaram os critérios de inclusão do estudo. Foi efetuada a colheita retrospectiva dos dados de cada processo clínico, selecionado de acordo com os critérios escolhidos, nos *endpoints* apropriados ao objetivo de estudo, sem uma avaliação enviesada dos mesmos. Não foi efetuado o cálculo prospetivo do tamanho da amostra, uma vez que se trata de um estudo preliminar. Tendo em conta os resultados da meta-análise anterior que revelaram desempenhos clínicos muito semelhantes entre os cimentos à base de MTA e os cimentos à base de silicatos tricálcicos e, com o objetivo de avaliar clinicamente a eficácia destas terapêuticas, procurou-se avaliar apenas os dois biomateriais estudados nesta tese. Assim, com critérios tão restritivos na escolha do biomaterial, não foi possível obter uma amostra de grandes dimensões. Os

critérios adicionais de estudos comparativos foram aplicados, com a escolha do biomaterial *gold standard* como grupo controlo, a contemporaneidade dos biomateriais, a equivalência de base em ambos os grupos e uma adequada análise estatística.

Como a utilização dos cimentos à base de silicato tricálcico é recente, existem poucos estudos relativos ao seu desempenho clínico em dentes permanentes. No presente estudo, as taxas de sucesso foram de 95%, elevadas e semelhantes às do cimento à base de MTA que foi de 100%. As comparações efetuadas mostraram que as taxas de sucesso obtidas não estão dependentes do fator idade ou do tipo de dente ou, ainda, da cavidade ou da etiologia da exposição pulpar. Os resultados observados no presente estudo são comparáveis com outros que revelam taxas de sucesso do Biodentine™ de 92,5% e do WhiteProRoot® MTA de 84,6% (Linu *et al.*, 2017). Outros estudos mencionam taxas de sucesso de 85%, 91,7% e 97,1% para cimentos à base de MTA após, 3, 1 e 9 anos de *follow up* respetivamente; e de 83,3% e 85,37% para cimentos à base de silicatos tricálcico com *follow up* de 1 ano (Bogen, Kim e Bakland, 2008; Hegde *et al.*, 2017; Jang *et al.*, 2015; Kundzina *et al.*, 2017). Alguns autores referem taxas de sucesso semelhantes entre os dois tipos de biomateriais, em dentes permanentes imaturos (Bhat *et al.*, 2014; Katge e Patil, 2017; Nowicka *et al.*, 2013).

A falência das terapêuticas é referenciada em alguns estudos, como ocorrendo nas primeiras semanas pós-terapêutica devido, principalmente, a comprometimento prévio do estado pulpar (Linu *et al.*, 2017). Este é difícil de diagnosticar através dos testes de sensibilidade, uma vez que este tipo de testes não avalia a vitalidade da polpa, mas afere apenas a sensibilidade através de uma avaliação sintomatológica subjetiva do doente. No presente estudo, a única falência da terapêutica registada ocorreu após 6 meses, avaliada com teste de percussão vertical positivo e teste com o cloreto de etilo negativo, deduzindo-se que os diagnósticos pré-terapêutica foram corretamente efetuados. É provável que uma causa individual esteja relacionada com esta perda de vitalidade, uma vez que o dente, ao longo dos outros tempos de avaliação, nunca teve alterações nos testes de sensibilidade e na avaliação radiográfica. No entanto, o facto da amostra do presente estudo ser pequena, pode ter contribuído para a ausência de diferenças estatisticamente significativas nas taxas de sucesso dos diferentes grupos. De facto, ao longo dos diversos períodos pós-terapêutica, apenas se

verificou um aumento do tempo e da intensidade da resposta positiva ao teste do cloreto de etilo em alguns casos. Ainda assim, verificou-se que esta alteração da resposta foi diminuindo gradualmente desde a 1ª semana até aos 6 meses, quer em percentagem de casos clínicos, quer na intensidade de resposta. Os testes de percussão foram positivos em alguns casos, mas pontualmente e sem recorrência nos vários tempos posteriores de controlo.

É reconhecido que o sucesso das terapêuticas de proteção pulpar diretas está dependente da seleção rigorosa dos casos com indicação para a mesma e da aplicação apropriada do protocolo de tratamento (Aguilar e Linsuwanont, 2011). Assim, os critérios de inclusão deste estudo clínico tiveram em conta esta premissa. Muitos dos casos incluídos no presente estudo tinham como etiologia de exposição a cárie dentária. Nestes casos é difícil, clinicamente, aferir do verdadeiro estado pulpar, o qual se reveste de uma importância extrema para o prognóstico. Alguns autores sugerem que o grau de hemorragia após a exposição é um bom indicador para aferir o estado inflamatório do tecido pulpar (Aguilar e Linsuwanont, 2011). A ocorrência de uma hemorragia intensa, difícil de controlar, é sugestivo de uma polpa com um estágio inflamatório moderado a severo e, portanto, sem indicação para efetuar a terapêutica de proteção pulpar direta (Andreasen, 2012).

O controlo desta hemorragia pulpar e a desinfecção da cavidade, durante as terapêuticas de proteção pulpar direta, são etapas decisivas que podem afetar a regeneração do tecido pulpar. O controlo da hemorragia deve ser efetuado exercendo pressão no local de exposição, durante 3 a 5 minutos, com uma bola de algodão esterilizada embebida numa solução. Vários autores têm estudado a eficácia e a influência destas soluções na regeneração do tecido pulpar (Accorinte *et al.*, 2007; Bal *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2001; Rôças e Siqueira, 2011). Embora a solução salina tenha efeitos limitados, é a tradicionalmente mais utilizada. Alguns autores referem que a solução salina a 0,9% tem resultados aceitáveis, mas inferiores a outras soluções como a clorhexidina e o hipoclorito de sódio (Bal *et al.*, 2011).

O hipoclorito de sódio é recomendado como solução de desinfecção cavitária em vários estudos (Bal *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2006). A eficácia desta ação, algumas vezes germicida, depende da concentração de hipoclorito não dissociado, que se traduz numa ação oxidativa nos grupos sulfídricos das enzimas bacterianas. Como estas enzimas são essenciais no metabolismo

bacteriano, algumas reações metabólicas importantes são interrompidas, resultando na morte bacteriana (Ayhan *et al.*, 1999; Bal *et al.*, 2011). A principal desvantagem da utilização desta solução é o seu efeito citotóxico sobre os tecidos pulpare. Alguns estudos *in vitro* demonstram que concentrações entre 2 a 5% não são citotóxicas para as células (Baldissera *et al.*, 2013). No entanto, outros autores recomendam concentrações mais baixas (cerca de 1%) conjugando uma citotoxicidade menor com um efeito bacteriostático (Ayhan *et al.*, 1999).

O digluconato de clorhexidina é uma bisguanida catiônica que atua sobre a parede externa das bactérias, causando a dispersão dos seus componentes intracelulares. Em concentrações baixas atua como um bacteriostático, devido à ação do potássio e do fósforo. Por outro lado, em altas concentrações (acima de 2%), tem um efeito bactericida, devido à ruptura da membrana bacteriana e à precipitação e/ou coagulação do citoplasma (Bal *et al.*, 2011; Bhandari, T S e Patil, 2014). Algumas das características da clorhexidina são vantajosas para esta terapêutica, nomeadamente a de ser absorvida pela hidroxiapatite e ser libertada gradualmente ao longo do tempo (Shahani e Subba, 2011). Alguns autores referem a sua eficácia como desinfetante cavitário, com redução significativa das populações bacterianas e fúngicas (Accorinte *et al.*, 2007; Bhandari, T S e Patil, 2014; Gomes *et al.*, 2001; Rôças e Siqueira, 2011; Rosenberg *et al.*, [s.d.]), enquanto outros questionam a sua efetividade em estudos com sistemas adesivos (Schuurs, Gruythuysen e Wesselink, 2000).

Alguns estudos referem que a utilização do hipoclorito de sódio em concentrações de 2,5% tem uma influência negativa sobre a formação da ponte dentinária, com resultados inferiores à solução salina (Accorinte *et al.*, 2007). No entanto, tanto a clorhexidina, como o hipoclorito de sódio, são duas soluções de desinfeção com atividade antibacteriana e, eventualmente, bactericida dependendo das concentrações, do tempo de exposição ou das formulações farmacêuticas utilizadas (Bal *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2001; Rôças e Siqueira, 2011). Num estudo em que foram utilizadas as duas soluções em diferentes concentrações, os autores concluíram que ambas tinham uma ação bactericida sobre os *enterococcus faecalis*, mas em tempos de exposição diferentes. Além disso, a eficácia da clorhexidina a 0,2%, 1% ou 2% e do hipoclorito de sódio a 5,25% eram semelhantes. No entanto, a solução de clorhexidina a 0,2% tinha um tempo de ação menor que a clorhexidina a 2% em gel (Gomes *et al.*, 2001).

É também referido que, tanto a clorhexidina a 2% como o hipoclorito de sódio a 5,25%, não interferem no processo de dentinogênese reparadora (Baldissera *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2006). Mesmo relativamente ao hipoclorito de sódio que tem a capacidade de dissolver o componente orgânico da dentina essencial para a estimulação das *stem cells* no processo de dentinogênese reparadora, não parece comprometer a expressão de glicoproteínas e, assim, não influenciar negativamente a reparação do tecido pulpar (Baldissera *et al.*, 2013). Mais recentemente, a solução de dicloridrato de octenidina tem sido estudada e comparada com os outros desinfetantes referidos, com resultados promissoriamente muito positivos, até superiores às outras soluções (Bal *et al.*, 2011; Tüzüner *et al.*, 2012), não havendo ainda estudos suficientes para que a sua utilização seja recomendada.

A elevada descoloração do cimento à base de MTA, já descrita noutros estudos, foi também um problema equacionado no nosso trabalho (Camilleri, 2014; Linu *et al.*, 2017; Marciano, Duarte e Camilleri, 2015). Alguns autores concluem que a descoloração dos tecidos dentários ocorre na presença de biomateriais com óxido de bismuto, não se verificando com cimentos à base de silicato tricálcico ou cimentos de Portland (Camilleri, 2014; Marciano, Duarte e Camilleri, 2015; Marconyak *et al.*, 2016; Mozyńska *et al.*, 2017; Vallés *et al.*, 2013). O óxido de bismuto, na presença de luz visível, dissocia-se em bismuto com uma cor metálica e em oxigénio. A combinação da luz com as condições anaeróbias, de forma semelhante ao que ocorre clinicamente, resulta em diferenças de coloração nestes materiais (Vallés *et al.*, 2013). Esta descoloração ocorre mais frequentemente na zona cervical e pode ser intensificada pela presença de hemorragia sanguínea no local de exposição pulpar, que se mantém em contato durante o tempo de presa do biomaterial (Felman e Parashos, 2013). Na presença de hipoclorito de sódio ocorre uma sobreoxidação do óxido de bismuto, aumentando a intensidade da descoloração sendo, por isso, recomendado por vários autores, a não utilização de hipoclorito de sódio como agente desinfetante quando se aplicam cimentos à base de MTA nos tecidos dentários (Camilleri, 2014; Hegde *et al.*, 2017; Marciano, Duarte e Camilleri, 2015).

Relativamente ao hipoclorito de sódio, a desnaturação das proteínas da dentina e a descoloração que induz nos tecidos dentários quando em contato com o óxido de bismuto, são desvantagens clínicas consideráveis. Estes fatores terão contribuído para a escolha da

clorhexidina como desinfetante cavitário e de controlo da hemorragia, na consulta externa de Dentisteria Operatória. O protocolo usualmente instituído nesta consulta prevê a utilização da clorhexidina numa concentração de 2% e com um tempo de aplicação de 3 minutos, de modo a se obter o máximo de eficácia com o mínimo de citotoxicidade, de acordo com a literatura (Bal *et al.*, 2011; Baldissera *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2006). Por esta razão, em todos os processos clínicos consultados, a clorhexidina era o desinfetante cavitário escolhido nas terapêuticas de proteção pulpar direta.

A técnica radiográfica de paralelismo com cone longo não é uma prática instituída na consulta externa de Dentisteria Operatória, não havendo registos radiográficos padronizados das terapêuticas efetuadas, nos processos clínicos. Assim, não foi possível realizar um estudo de comparação radiográfica. Este teria sido útil para aferir a formação e a qualidade da ponte dentinária, como realizado noutros estudos (Nowicka *et al.*, 2013, 2015; Zarrabi *et al.*, 2010). No entanto, na avaliação deste parâmetro, há resultados muito dispares, dependendo se a radiografia é realizada apenas sob a premissa de observar uma ponte dentinária incompleta ou já completa com uma espessura considerável. Ainda assim, os resultados dos diversos estudos referem valores muito semelhantes entre os biomateriais, entre 85% e 95%, quando a avaliação refere a existência de ponte dentinária, ainda que incompleta (Bogen, Kim e Bakland, 2008; Katge e Patil, 2017). Na revisão sistemática e na meta-análise efetuada no capítulo anterior para estes biomateriais, a edificação da ponte dentinária de forma completa ocorre em 47% dos casos com a utilização de cimentos à base de silicatos tricálcico e em 36% para os cimentos à base de MTA.

No entanto, também está descrito na literatura que a radiopacidade relativamente baixa dos cimentos à base de silicato tricálcico, quando comparados com os cimentos à base de MTA, pode dificultar este tipo de avaliação (Tanalp *et al.*, 2013). Os valores de radiopacidade próximos dos do tecido dentinário pode levar a resultados inconclusivos (Kaup, Schäfer e Dammaschke, 2015; Linu *et al.*, 2017). Alguns estudos têm sido efetuados na tentativa de aumentar a radiopacidade destes materiais, com adição de nanopartículas de óxido de bismuto, sem alteração das propriedades dos mesmos (Saghiri *et al.*, 2015).

Na extração de dados dos processos clínicos verificou-se que tinha sido sempre preconizada a utilização de bases cavitárias com cimento de ionómero de vidro, depois de aplicados os biomateriais sobre os locais de exposição. No entanto, de acordo com alguns autores e com o fabricante do biomaterial à base de silicatos tricálcico, o tempo de presa é muito reduzido, podendo ser realizada a restauração definitiva na mesma consulta sem a necessidade de colocar uma base entre o biomaterial e os materiais restauradores. Alguns autores referem, ainda, a utilização do cimento de silicato tricálcico como substituto integral de todo o tecido dentinário, utilizando uma técnica restauradora de *sandwich* (Hegde *et al.*, 2017; Koubi *et al.*, 2013; Martens, Rajasekharan e Cauwels, 2015; Rajasekharan *et al.*, 2014).

As técnicas adesivas efetuadas neste estudo, sejam a de utilização de sistemas adesivos do tipo *total etch* ou do tipo *self etch* com condicionamento ácido seletivo ao esmalte são as recomendadas por muitos autores como sendo as que apresentam melhores valores de adesão e, conseqüentemente, melhor desempenho clínico (Abdalla *et al.*, 2010; Nawareg *et al.*, 2015; Peumans *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2015; Zhang e Wang, 2012, 2013).

Observou-se, também, que as restaurações definitivas foram efetuadas através da técnica direta ou indireta com as resinas compostas, como recomendação da literatura (Baldissera *et al.*, 2013; Baroudi e Rodrigues, 2015; Ferracane, 2011; Opdam *et al.*, 2014; Sande, van de *et al.*, 2013; Syed, Chopra e Sachdev, 2015). Os resultados das avaliações radiográficas realizadas às restaurações ao longo do estudo revelando ausência de sinais de cárie secundária, corroboram esta recomendação.

A avaliação radiográfica permitiu pesquisar sinais de patologia periapical, o que se revelou sempre negativo, corroborando os resultados dos testes de sensibilidade relatados. Nos exames radiográficos não foram detetadas calcificações difusas no espaço pulpar, tal como referenciado noutros estudos. Alguns autores referem a calcificação completa do espaço pulpar com *follow ups* de 9 anos (Komabayashi e Zhu, 2010). Esta metamorfose de calcificação é considerada um falha biológica na função do tecido pulpar, uma vez que a formação de tecido mineralizado deve estar restrita ao local da lesão ou da exposição pulpar (Bal *et al.*, 2011). Estas calcificações pulpares podem comprometer os tratamentos endodônticos que estejam indicados no futuro.

As principais limitações deste estudo clínico retrospectivo foram a amostra reduzida e o período curto de avaliação pelo que foi considerado preliminar. Tempos de avaliação mais longos e amostras de maiores dimensões, seriam importantes para avaliar as alterações intrapulpares decorrentes destas terapêuticas e a formação efetiva de uma ponte dentinária no local da exposição (Olsson, Petersson e Rohlin, 2006). Seria igualmente recomendável avaliar histologicamente, ao longo do tempo, as terapêuticas de proteção pulpar. Esta avaliação apenas seria exequível em estudos clínicos aleatorizados, envolvendo dentes com indicação para extração.

PARTE IV — CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os biomateriais utilizados em proteções pulpar diretas devem atuar como barreiras de proteção salvaguardando a vitalidade do tecido pulpar, recobrando o tecido exposto e, conseqüentemente, prevenindo a necessidade de posteriores terapêuticas endodônticas. Devido a este facto os materiais a utilizar nesta terapêutica devem proporcionar uma resposta apropriada do hospedeiro, ou seja, os tecidos em contato com os materiais não devem evidenciar sinais de toxicidade, irritabilidade e/ou inflamação, nem quaisquer alérgenos, genotóxicos ou carcinogénios (Poggio *et al.*, 2014). Ao longo do nosso trabalho foram apresentados e discutidos os resultados obtidos no estudo experimental *in vitro* e *in vivo* em modelo animal e clínico. No entanto, há conclusões que respondem às premissas referidas atrás sobre os biomateriais, que importa destacar, assim como, perspetivar a que se deve responder no futuro com novas investigações nesta área.

No estudo *in vitro* concluiu-se que o biomaterial Life[®] apresentou os piores resultados, especialmente em concentrações elevadas, uma vez que diminuiu a atividade metabólica e a viabilidade celulares, com aumento acentuado da morte celular e de alterações consideráveis do ciclo celular. Em consequência, a síntese proteica e a formação de depósitos de cálcio é inexistente. Relativamente aos outros biomateriais, o WhiteProRoot[®]MTA e o Biodentine[™], os resultados são consideravelmente positivos, demonstrando aumento da atividade metabólica e da viabilidade celulares, com uma elevada percentagem de células vivas e sem interferência no ciclo celular. Relativamente aos estádios de diferenciação e de mineralização, os resultados demonstram melhor desempenho do Biodentine[™], com acentuado aumento da fosfatase alcalina, da sialoproteína da dentina e da formação de depósitos de cálcio em relação ao WhiteProRoot[®]MTA, para todas as concentrações estudadas.

Os estudos *in vivo* corroboraram o reduzido efeito citotóxico sobre as células da polpa dentária, com sinais inflamatórios ligeiros e reversíveis, com a formação de tecido mineralizado para os biomateriais WhiteProRoot®MTA e Biodentine™, estando, no entanto, esta muito exacerbada com este último biomaterial.

No que toca ao estudo clínico e, em especial, quanto à revisão sistemática efetuada previamente, concluiu-se que os cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentam taxas de sucesso mais reduzidas do que os cimentos à base de agregados de trióxido minerais, nos trabalhos com tempos de estudo mais prolongados, uma vez que são os biomateriais com utilização clínica mais prolongada. As taxas de sucesso dos cimentos à base de silicatos tricálcicos são semelhantes às dos cimentos à base de agregados de trióxido minerais, embora consideradas em estudos limitados no tempo devido à sua utilização clínica recente. Os outros materiais sugeridos e utilizados em proteções pulpares diretas nos últimos anos, como os sistemas adesivos, a hidroxiapatite e as proteínas morfogenéticas da matriz de esmalte revelaram taxas de sucesso muito inferiores aos dos cimentos à base de hidróxido de cálcio e agregados trióxidos minerais, não sendo recomendada a sua utilização. As terapêuticas que utilizam o laser associado a biomateriais revelaram taxas de sucesso elevadas, não sendo, no entanto, consideradas terapêuticas de primeira escolha. Na outra vertente do estudo clínico, na qual foram avaliadas retrospectivamente as terapêuticas de proteção pulpar direta, concluiu-se que as taxas de sucesso do WhiteProRoot®MTA e do Biodentine™ são semelhantes, coincidindo com os resultados da meta-análise efetuada.

Analisados os resultados dos três estudos efectuados no nosso projeto de doutoramento, podemos concluir que:

- O biomaterial Life® poderá influenciar negativamente a proliferação das células da polpa;
- O biomaterial WhiteProRoot®MTA tem indicação para este tipo de terapêuticas, justificando o seu reconhecimento como *gold standard*;
- O biomaterial Biodentine™ pode ser uma alternativa neste tipo de terapêutica, uma vez que não apresenta algumas das desvantagens importantes que ocorrem quando da aplicação do WhiteProRoot®MTA, nomeadamente a dificuldade de manipulação clínica, o tempo elevado de

presa não compatível com os tempos de clínica, o elevado custo e o potencial de descoloração da estrutura dentária.

No entanto, devido à falta de estudos observacionais, de *cohort* prospectivos ou retrospectivos, é difícil inferir concretamente se os cimentos de silicato tricálcico são superiores aos cimentos à base de agregados trióxido minerais. Estes estudos tornam-se, ainda mais importantes, tendo em conta os resultados muito superiores do Biodentine™ relativos à formação de depósitos de cálcio, que foram demonstrados no estudo *in vitro* e *in vivo*. O potencial risco de calcificações intrapulpares é elevado e só poderá ser avaliado com estudos clínicos a longo prazo. Assim, em linha de continuidade com este, o estudo clínico retrospectivo preliminar numa tentativa de responder a esta questão, deve ser perspectivado o seu alargamento e, deve ser desenvolvido um estudo clínico de *cohort* prospectivo e retrospectivo com os biomateriais Life®, WhiteProRoot®MTA e Biodentine™.

Os efeitos secundários destes biomateriais a nível local, nomeadamente os efeitos inflamatórios sobre o tecido pulpar, foram também abordados neste trabalho e têm sido amplamente estudados noutras investigações. No entanto, os efeitos a nível sistémico, nomeadamente a nível hepático e cerebral, não são conhecidos. Perspetivamos a consecução de um estudo em modelo animal *in vivo* com objetivo de avaliar a toxicidade sistémica destes biomateriais quando utilizados na cavidade oral.

Alguns biomateriais mais comuns, como os utilizados neste nosso estudo, adicionados a outros materiais acídicos são capazes de solubilizar proteínas bioativas presentes na matriz dentinária. Como já foi referido na descrição dos biomateriais, estas moléculas podem estimular a regeneração natural do tecido pulpar através de um processo da dentinogénese reparadora. Novos cimentos biocerâmicos têm vindo a ser desenvolvidos com base nesta premissa. No futuro, será importante avaliá-los *in vitro*, *in vivo* e clinicamente. Será também importante estudar a capacidade regenerativa destes novos biomateriais, avaliando a sua eventual eficácia para reverter processos inflamatórios, até aqui, considerados irreversíveis ou o seu potencial para regenerar efetivamente um tecido pulpar remanescente após um processo patológico.

Embora neste momento o diagnóstico do estado pulpar seja uma premissa fundamental para o sucesso das terapêuticas de proteção pulpar direta, o desenvolvimento destas

investigações poderá alterar por completo o paradigma do diagnóstico e do prognóstico na patologia do tecido pulpar, abrindo o longo caminho para a regeneração do órgão dentário.

PARTE V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, Ali I. *et al.* - Bond efficacy and interface morphology of self-etching adhesives to ground enamel. **The journal of adhesive dentistry**. 12:1 (2010) 19–25.

ABOUT, I. *et al.* - Human dentin production in vitro. **Experimental cell research**. 258:1 (2000) 33–41.

ABOUT, I. - Dentin Regeneration in vitro: the Pivotal Role of Supportive Cells. **Advances in Dental Research**. 23:3 (2011) 320–324.

ACCORINTE, M. *et al.* - Influence of rubber dam isolation on human pulp responses after capping with calcium hydroxide and an adhesive system. **Quintessence international**. 37:3 (2006) 205–12.

ACCORINTE, M. *et al.* - Effects of hemostatic agents on the histomorphologic response of human dental pulp capped with calcium hydroxide. **Quintessence international**. 38:10 (2007) 843–52.

ACCORINTE, M. L. R. *et al.* - Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. **Operative dentistry**. 33:5 (2008) 488–95.

ACCORINTE, M. L. R. *et al.* - Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. **International endodontic journal**. 42:2 (2009) 122–8.

ACCORINTE, Maria De Lourdes R. *et al.* - Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. **Journal of endodontics**. 34:1 (2008) 1–6.

ACCORINTE, Maria De Lourdes Rodrigues *et al.* - Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. **Dental materials**. 21:7 (2005) 599–607.

AEINEHCHI, M. *et al.* - Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. **International endodontic journal**. 36:3 (2003) 225–31.

AGUILAR, Panuroot; LINSUWANONT, Pairoj - Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. **Journal of endodontics**. 37:5 (2011) 581–7.

AKHLAGHI, Najmeh; KHADEMI, Abbasali - Outcomes of vital pulp therapy in permanent teeth with different medicaments based on review of the literature. **Dental research journal**. 12:5 (2015) 406–17.

AL-HEZAIMI, Khalid *et al.* - Efficacy of the enamel matrix derivative in direct pulp capping procedures: a systematic review. **Australian endodontic journal**. 39:3 (2013) 171–5.

ALLARD, B. *et al.* - Voltage-gated Sodium Channels Confer Excitability to Human Odontoblasts: POSSIBLE ROLE IN TOOTH PAIN TRANSMISSION. **Journal of Biological Chemistry**. 281:39 (2006) 29002–29010.

ALSHWAIMI, Emad; MAJEED, Abdul; ALI, Aiman A. - Pulpal Responses to Direct Capping with Betamethasone/Gentamicin Cream and Mineral Trioxide Aggregate: Histologic and Micro-Computed Tomography Assessments. **Journal of Endodontics**. 42:1 (2016) 30–35.

ANDREASEN, Jens O. - Pulp and periodontal tissue repair - regeneration or tissue metaplasia after dental trauma. A review. **Dental traumatology**. 28:2012) 19–24.

ANTUNES BORTOLUZZI, Eduardo *et al.* - The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. **Journal of endodontics**. 32:12 (2006) 1194–7.

ARANA-CHAVEZ, Victor E.; MASSA, Luciana F. - Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 36:8 (2004) 1367–1373.

ASGARY, Saeed *et al.* - The Properties of a New Endodontic Material. **Journal of Endodontics**. 34:8 (2008) 990–993.

ASGARY, Saeed *et al.* - A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**. 106:4 (2008) 609–14.

ASLAM, Sadaf; EMMANUEL, Patricia - Formulating a researchable question: A critical step for facilitating good clinical research. **Indian J Sex Transm Dis**. 31:1 (2010) 47–50.

ATARI, M. *et al.* - The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. **Bone**. 50:4 (2012) 930–41.

AUSCHILL, Thorsten M. *et al.* - [Success rate of direct pulp capping with calcium hydroxide]. **Schweizer Monatsschrift fur Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odontostomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia**. 113:9 (2003) 946–52.

AYHAN, H. *et al.* - Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **International endodontic journal**. 32:2 (1999) 99–102.

BAE, Won-Jung *et al.* - Odontogenic responses of human dental pulp cells to collagen/nanobioactive glass nanocomposites. **Dental materials**. 28:12 (2012) 1271–9.

BAL, Cenkhan *et al.* - Effects of Antiseptics on Pulpal Healing under Calcium Hydroxide Pulp

Capping: A Pilot Study. **European journal of dentistry**. 5:3 (2011) 265–72.

BALDINI, P. M. *et al.* - Differential sensitivity of human monocytes and macrophages to ANP: a role of intracellular pH on reactive oxygen species production through the phospholipase involvement. **Journal of leukocyte biology**. 73:4 (2003) 502–10.

BALDISSERA, E. *et al.* - Tenascin and fibronectin expression after pulp capping with different hemostatic agents: a preliminary study. **Brazilian dental journal**. 24:3 (2013) 188–93.

BALDISSERA, R. *et al.* - Are there universal restorative composites for anterior and posterior teeth? **Journal of dentistry**. 41:11 (2013) 1027–35.

BAROUDI, Kusai; RODRIGUES, Jean C. - Flowable Resin Composites: A Systematic Review and Clinical Considerations. **Journal of clinical and diagnostic research**. 9:6 (2015) ZE18-24.

BARTHEL, C. R. *et al.* - Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. **Journal of endodontics**. 26:9 (2000) 525–8.

BERKOVITZ, B. K. B.; HOLLAND, G. R.; MOXHAM, B. J. - **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal**. 3ª Edição ed. ISBN 8536302569, 9788536302560.

BHANDARI, Sonam; T S, Ashwini; PATIL, Chetan R. - An in Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of 2% Chlorhexidine Gel, Propolis and Calcium Hydroxide Against Enterococcus faecalis in Human Root Dentin. **Journal of clinical and diagnostic research**. 8:11 (2014) ZC60-3.

BHAT, Sham S. *et al.* - Direct pulp capping in an immature incisor using a new bioactive material. **Contemporary clinical dentistry**. 5:3 (2014) 393–6.

BLEICHER, Françoise - Odontoblast physiology. **Experimental Cell Research**. 325:2 (2014) 65–71.

BOGEN, George; KIM, Jay S.; BAKLAND, Leif K. - Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. **Journal of the American Dental Association**. 139:3 (2008) 305-15-15.

BRIZUELA, Claudia *et al.* - Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. **Journal of endodontics**. 43:11 (2017) 1776–1780.

BUTLER, W. T. - Dentin matrix proteins and dentinogenesis. **Connective tissue research**. 33:1–3 (1995) 59–65.

BUTLER, W. T. - Dentin matrix proteins. **European journal of oral sciences**. 106 Suppl:1998) 204–10.

BUTLER, W. T.; RITCHIE, H. - The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. **The International journal of developmental biology**. 39:1 (1995) 169–79.

BYERS, M. R.; NÄRHI, M. V - Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 10:1 (1999) 4–39.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. - Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International microbiology**. 3:1 (2000) 3–8.

CAI, Shiwei; ZHANG, Wenjian; CHEN, Wei - PDGFR β +/*c-kit*+ pulp cells are odontoblastic progenitors capable of producing dentin-like structure in vitro and in vivo. **BMC Oral Health**. 16:1 (2016) 113.

CAMARGO, S. E. A. *et al.* - Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. **International Endodontic Journal**. 42:3 (2009) 227–237.

CAMILLERI, J. *et al.* - Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. **International endodontic journal**. 37:10 (2004) 699–704.

CAMILLERI, J. *et al.* - The constitution of mineral trioxide aggregate. **Dental Materials**. 21:4 (2005) 297–303.

CAMILLERI, J.; PITT FORD, T. R. - Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **International Endodontic Journal**. 39:10 (2006) 747–754.

CAMILLERI, Josette - Investigation of Biodentine as dentine replacement material. **Journal of Dentistry**. 41:7 (2013) 600–610.

CAMILLERI, Josette - Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. **Journal of Endodontics**. 40:12 (2014) 2030–2035.

CAMILLERI, Josette - Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. **Journal of endodontics**. 40:3 (2014) 436–40.

CAMILLERI, Josette; SORRENTINO, François; DAMIDOT, Denis - Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. **Dental Materials**. 29:5 (2013) 580–593.

CAMPS, J. *et al.* - Two- versus three-dimensional in vitro differentiation of human pulp cells into odontoblastic cells. **Connective tissue research**. 43:2–3 (2002) 396–400.

CARVALHO, A.; SILVA, V.; GRANDE, A. - Avaliação do risco de viés de ensaios clínicos randomizados pela ferramenta da colaboração Cochrane. **Diagn Tratamento**. 18:1 (2013) 38–44.

CAVALCANTI, Bruno Neves *et al.* - Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 β and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian oral research**. 25:1 (2011) 13–8.

CHANDER, N.Gopi - Standardization of in vitro studies. **Journal of Indian Prosthodontic Society**. 16:3 (2016) 227–8.

CHANG, S. *et al.* - Effects of ProRoot MTA, bioaggregate, and micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**. 40:1 (2014) 113–118.

CHANG, S. *et al.* - Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. **Journal of endodontics**. 40:8 (2014) 1194–200.

CHEN, Liang; SUH, Byoung In - Cytotoxicity and biocompatibility of resin-free and resin-modified direct pulp capping materials: A state-of-the-art review. **Dental materials journal**. 36:1 (2017) 1–7.

COLEMAN, J. E. - Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**. 21:1992) 441–83.

COOPER, Paul R. *et al.* - Inflammation—regeneration interplay in the dentine—pulp complex. **Journal of Dentistry**. 38:9 (2010) 687–697.

COUBLE, M. L. *et al.* - Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. **Calcified tissue international**. 66:2 (2000) 129–38.

COUVE, E.; OSORIO, R.; SCHMACHTENBERG, O. - Reactionary Dentinogenesis and Neuroimmune Response in Dental Caries. **Journal of dental research**. 93:8 (2014) 788–93.

CRANE, Lynnsey E. - Hard tissue barrier formation after pulp capping? **Evidence-based dentistry**. 7:4 (2006) 95.

DALTOÉ, Mariana O. *et al.* - Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of endodontics**. 42:4 (2016) 596–603.

DAMMASCHKE, Till - Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. **Laboratory animals**. 44:1 (2010) 1–6.

DAMMASCHKE, Till *et al.* - Mineral trioxide aggregate for direct pulp capping: a histologic

comparison with calcium hydroxide in rat molars. **Quintessence international**. 41:2 (2010) e20-30.

DAMMASCHKE, Till *et al.* - A histologic investigation of direct pulp capping in rodents with dentin adhesives and calcium hydroxide. **Quintessence international**. 41:4 (2010) e62-71.

DAMMASCHKE, Till; LEIDINGER, Jana; SCHÄFER, Edgar - Long-term evaluation of direct pulp capping--treatment outcomes over an average period of 6.1 years. **Clinical oral investigations**. 14:5 (2010) 559–67.

DANESH, F. *et al.* - Effect of white mineral trioxide aggregate compared with biomimetic carbonated apatite on dentine bridge formation and inflammatory response in a dental pulp model. **International endodontic journal**. 45:1 (2012) 26–34.

DANESH, G. *et al.* - A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. **International Endodontic Journal**. 39:3 (2006) 213–219.

DARVELL, B. W.; WU, R. C. T. - «MTA»—An Hydraulic Silicate Cement: Review update and setting reaction. **Dental Materials**. 27:5 (2011) 407–422.

DECUP, F. *et al.* - Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. **Clinical oral investigations**. 4:2 (2000) 110–9.

DEMARCO, F. F. *et al.* - Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quintessence international**. 32:3 (2001) 211–20.

DEMARCO, Flavio F. *et al.* - Effects of Morphogen and Scaffold Porogen on the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Endodontics**. 36:11 (2010) 1805–1811.

DEMARCO, Flávio Fernando *et al.* - Dental pulp tissue engineering. **Brazilian dental journal**. 22:1 (2011) 3–13.

DENG, Yang *et al.* - Laser use in direct pulp capping: A meta-analysis. **Journal of the American Dental Association**. 147:12 (2016) 935–942.

DIKALOV, S.; GRIENGLING, K. K.; HARRISON, D. G. - Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. **Hypertension**. 49:4 (2007) 717–727.

DING, Shinn Jyn *et al.* - The Physical and Cytological Properties of White MTA Mixed with Na₂HPO₄ as an Accelerant. **Journal of Endodontics**. 34:6 (2008) 748–751.

DOMINGUEZ, Mercedes S. *et al.* - Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. **Journal of endodontics**. 29:5 (2003) 324–33.

DOUGLAS, R. S. *et al.* - A simplified method for the coordinate examination of apoptosis and surface phenotype of murine lymphocytes. **Journal of immunological methods**. 188:2 (1995) 219–28.

DUAN, Xiaohong *et al.* - Odontoblast-like MDPC-23 cells function as odontoclasts with RANKL/M-CSF induction. **Archives of Oral Biology**. 58:3 (2013) 272–278.

EID, Ashraf A. *et al.* - In Vitro Biocompatibility Evaluation of a Root Canal Filling Material That Expands on Water Sorption. **Journal of Endodontics**. 39:7 (2013) 883–888.

EID, Ashraf A. *et al.* - In Vitro Osteogenic/Dentinogenic Potential of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement. **Journal of Endodontics**. 39:9 (2013) 1161–1166.

EID, Ashraf A. *et al.* - In Vitro Biocompatibility and Oxidative Stress Profiles of Different Hydraulic Calcium Silicate Cements. **Journal of Endodontics**. 40:2 (2014) 255–260.

ELIAS, Raquel V *et al.* - Pulp responses to the application of a self-etching adhesive in human pulps after controlling bleeding with sodium hypochlorite. **Quintessence international**. 38:2 (2007) e67-77.

ELL, Peter; GAMBHIR, Sam - **Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment**. 3rd Editio ed. [S.l.] : Elsevier, 2004. ISBN 9780702043239.

EMBERY, G. *et al.* - Proteoglycans in dentinogenesis. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 12:4 (2001) 331–49.

FABER, Timor *et al.* - Meta-analyses including non-randomized studies of therapeutic interventions: a methodological review. **BMC medical research methodology**. 16:2016) 35.

FARACO, I. M.; HOLLAND, R. - Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. **Dental traumatology**. 17:4 (2001) 163–6.

FARHAD, Alireza; MOHAMMADI, Zahed - Calcium hydroxide: a review. **International dental journal**. 55:5 (2005) 293–301.

FARSI, Najat *et al.* - Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth. **The Journal of clinical pediatric dentistry**. 31:2 (2006) 72–6.

FELMAN, Daniel; PARASHOS, Peter - Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**. 39:4 (2013) 484–7.

FERNANDES, Alexandre M. *et al.* - Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. 105:3 (2008) 385–390.

FERNÁNDEZ-YÁÑEZ SÁNCHEZ, Angela; LECO-BERROCAL, M.Isabel; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, José M. - Metaanalysis of filler materials in periapical surgery. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**. 13:3 (2008) E180-5.

FERRACANE, Jack L. - Resin composite--state of the art. **Dental materials**. 27:1 (2011) 29–38.

FERRACANE, Jack L.; COOPER, Paul R.; SMITH, Anthony J. - Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology**. 98:1 (2010) 2–14.

FERREIRA, Maily Rehder Wimmers *et al.* - Undifferentiated pulp cells and odontoblast-like cells share genes involved in the process of odontogenesis. **Archives of Oral Biology**. 60:4 (2015) 593–599.

FERREIRA, Manuel Marques - **Transplantes dentários: alterações pulpares e das superfícies radiculares**. [S.l.] : Universidade de Coimbra, 2009

FONSECA, T. S. DA *et al.* - In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. **International endodontic journal**. 49:2 (2016) 145–53.

FORD, T. R. *et al.* - Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **Journal of the American Dental Association**. 127:10 (1996) 1491–4.

FOREMAN, P. C.; BARNES, I. E. - Review of calcium hydroxide. **International endodontic journal**. 23:6 (1990) 283–97.

FRANQUIN, J. C. *et al.* - Immunocytochemical detection of apoptosis in human odontoblasts. **European journal of oral sciences**. 106 Suppl:1998) 384–7.

FRANSSON, H.; PETERSSON, K.; DAVIES, J. R. - Dentine sialoprotein and Collagen I expression after experimental pulp capping in humans using Emdogain®Gel. **International Endodontic Journal**. 44:3 (2011) 259–267.

FRANSSON, H.; WOLF, E.; PETERSSON, K. - Formation of a hard tissue barrier after experimental pulp capping or partial pulpotomy in humans: an updated systematic review. **International Endodontic Journal**. 49:6 (2016) 533–542.

FRESHNEY, R.Ian - Database of misidentified cell lines. **International journal of cancer**. 126:1 (2010) 302.

FRIED, K. *et al.* - Molecular signaling and pulpal nerve development. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 11:3 (2000) 318–32.

FUJISAWA, Ryuichi; MIZUNO, Morimichi; TAMURA, Masato - Effect of dentin phosphoprotein

on phosphate-induced apoptosis of odontoblast-like cells. **Cells, tissues, organs**. 189:1–4 (2009) 60–4.

GANDOLFI, Maria Giovanna *et al.* - Ion Release, Porosity, Solubility, and Bioactivity of MTA Plus Tricalcium Silicate. **Journal of Endodontics**. 40:10 (2014) 1632–1637.

GANDOLFI, Maria Giovanna *et al.* - Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**. 13:1 (2015) 0–0.

GARANT, Philiat R. - Dentin. Em ARINNE DICKSON (Ed.) - **Oral Cells and Tissues**. Carol Stream : Quintessence Publishing Co, Inc, 2003. p. 25–52.

GARANT, Philiat R. - Enamel. Em ARINNE DICKSON (Ed.) - **Oral Cells and Tissues**. Carol Stream : Quintessence Publishing Co, Inc, 2003. p. 53–80.

GOLDBERG, M. *et al.* - Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. **Advances in dental research**. 15:2001) 91–5.

GOLDBERG, M.; SEPTIER, D. - Phospholipids in amelogenesis and dentinogenesis. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 13:3 (2002) 276–90.

GOLDBERG, Michel *et al.* - Bioactive molecules and the future of pulp therapy. **American journal of dentistry**. 16:1 (2003) 66–76.

GOLDBERG, Michel *et al.* - Dentin: structure, composition and mineralization. **Frontiers in bioscience**. 3:1 (2011) 711–35.

GOLDBERG, Michel - **The Dental Pulp**. [S.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2014. ISBN 978-3-642-55159-8.

GOMES, B. P. *et al.* - In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International endodontic journal**. 34:6 (2001) 424–8.

GONÇALVES, Jorge Luis *et al.* - Evaluation of physico-chemical properties of Portland cements and MTA. **Brazilian oral research**. 24:3 (2010) 277–83.

GRECH, L.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. - Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. **International Endodontic Journal**. 46:7 (2013) 632–641.

GREWAL, Navneet *et al.* - Comparative evaluation of calcium silicate-based dentin substitute (Biodentine®) and calcium hydroxide (pulpdent) in the formation of reactive dentin bridge in regenerative pulpotomy of vital primary teeth: Triple blind, randomized clinical trial.

Contemporary clinical dentistry. 7:4 (2016) 457–463.

HANKS, C. *et al.* - Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connective tissue research.** 37:3–4 (1998) 233–49.

HANKS, C. *et al.* - Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. **European journal of oral sciences.** 106 Suppl:suppl 1 (1998) 260–6.

HARVEY ZIESSMAN; O'MALLEY, Janis - **Nuclear Medicine: The Requisites.** 4th Editio ed. ISBN 9780323249621.

HEBLING, J.; GIRO, E. M.; COSTA, C. A. - Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. **Journal of endodontics.** 25:10 (1999) 676–82.

HEGDE, Swaroop *et al.* - Clinical evaluation of mineral trioxide aggregate and biodentine as direct pulp capping agents in carious teeth. **Journal of conservative dentistry.** 20:2 (2017) 91–95.

HELING, I.; ZALKIND, M.; SELA, J. - Pulp capping with hydroxyapatite ceramic in rat molars. **Israel journal of dental sciences.** 2:3 (1989) 128–32.

HILLMANN, G.; GEURTSSEN, W. - Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. **Cell and tissue research.** 289:1 (1997) 145–54.

HILTON, T. J. *et al.* - Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. **Journal of dental research.** 92:7 Suppl (2013) 165–225.

HÖRSTED-BINDSLEV, Preben; VILKINIS, Valdas; SIDLAUSKAS, Antanas - Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.** 96:5 (2003) 591–600.

HORSTED, P. *et al.* - A retrospective study of direct pulp capping with calcium hydroxide compounds. **Endodontics & dental traumatology.** 1:1 (1985) 29–34.

HUANG, George T. J.; SHAGRAMANOVA, Kristina; CHAN, Selina W. - Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. **Journal of endodontics.** 32:11 (2006) 1066–73.

ISHII, Tetsuro; ITOH, Ken; YAMAMOTO, Masayuki - Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. **Methods in enzymology.** 348:2002) 182–90.

ISO, International Organization For Standardization - ISO 7405: 2008 Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry—tests methods for dental materials.

2008).

ISO, International Organization For Standardization - ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices - part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009).

IWAMOTO, Claudio E. *et al.* - Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. **American journal of dentistry**. 19:2 (2006) 85–90.

JABER, L.; MASCRÈS, C.; DONOHUE, W. B. - Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxylapatite direct pulp capping in rats. **Journal of oral pathology & medicine**. 20:10 (1991) 502–8.

JAFARNIA, Behnam *et al.* - Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. 107:5 (2009) 739–744.

JALAN, Anushka Lalit; WARHADPANDE, Manjusha M.; DAKSHINDAS, Darshan M. - A comparison of human dental pulp response to calcium hydroxide and Biodentine as direct pulp-capping agents. **Journal of conservative dentistry**. 20:2 (2017) 129–133.

JANG, Youngjune *et al.* - A Randomized Controlled Study of the Use of ProRoot Mineral Trioxide Aggregate and Endocem as Direct Pulp Capping Materials: 3-month versus 1-year Outcomes. **Journal of Endodontics**. 41:8 (2015) 1201–1206.

JAVED, Fawad *et al.* - Role of laser irradiation in direct pulp capping procedures: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in medical science**. 32:2 (2017) 439–448.

JEANNEAU, Charlotte *et al.* - Light-cured Tricalcium Silicate Toxicity to the Dental Pulp. **Journal of endodontics**. 2017).

JOHN, Justin C. ST. *et al.* - The Analysis of Mitochondria and Mitochondrial DNA in Human Embryonic Stem Cells. Em **Human Embryonic Stem Cell Protocols**. [S.l.] : Humana Press, 2006. p. 347–374.

JONTELL, M. *et al.* - Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 9:2 (1998) 179–200.

JUNG, J. Y. *et al.* - Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp cells. **International endodontic journal**. 48:2 (2015) 177–84.

KALEJTA, R. F.; SHENK, T.; BEAVIS, A. J. - Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. **Cytometry**. 29:4 (1997) 286–91.

KARIM, Ikhlas A. EL *et al.* - Biodentine Reduces Tumor Necrosis Factor Alpha-induced TRPA1 Expression in Odontoblastlike Cells. **Journal of endodontics**. 42:4 (2016) 589–95.

KATGE, Farhin A.; PATIL, Devendra P. - Comparative Analysis of 2 Calcium Silicate-based Cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as Direct Pulp-capping Agent in Young Permanent Molars: A Split Mouth Study. **Journal of endodontics**. 43:4 (2017) 507–513.

KAUP, Markus; SCHÄFER, Edgar; DAMMASCHKE, Till - An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. **Head & face medicine**. 11:2015) 16.

KIATWATEERATANA, T. *et al.* - Partial pulpotomy on caries-free teeth using enamel matrix derivative or calcium hydroxide: a randomized controlled trial. **International Endodontic Journal**. 42:7 (2009) 584–592.

KIM, Jia *et al.* - Evaluation of reparative dentin formation of ProRoot MTA, Biodentine and BioAggregate using micro-CT and immunohistochemistry. **Restorative dentistry & endodontics**. 41:1 (2016) 29–36.

KITASAKO, Y.; INOKOSHI, S.; TAGAMI, J. - Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. **Journal of dentistry**. 27:4 (1999) 257–63.

KOMABAYASHI, Takashi; SPÅNGBERG, Larz S. W. - Comparative Analysis of the Particle Size and Shape of Commercially Available Mineral Trioxide Aggregates and Portland Cement: A Study with a Flow Particle Image Analyzer. **Journal of Endodontics**. 34:1 (2008) 94–98.

KOMABAYASHI, Takashi; ZHU, Qiang - Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**. 109:5 (2010) e75-81.

KOUBI, Gilles *et al.* - Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth — a prospective study. **Clinical Oral Investigations**. 17:1 (2013) 243–249.

KOULAOUZIDOU, Elisabeth A. *et al.* - In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. **Journal of oral science**. 50:4 (2008) 397–402.

KRAVITZ, AS; BULLOCK, A.; COWPE, J. - **Manual of Dental Practice 2015**. 5.1 ed. Cardiff University, Wales, United Kingdom : [s.n.]

KUNDZINA, R. *et al.* - Capping carious exposures in adults: a randomized controlled trial investigating mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide. **International endodontic journal**. 50:10 (2017) 924–932.

KURATATE, Momoko *et al.* - Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. **Journal of endodontics**. 34:8 (2008) 970–4.

LANCELOT, Sophie; GIAMMARILE, Francesco; TESCARU, Agnes - Paraneoplastic syndrome demonstrated on ^{99m}Tc-HMDP bone scan. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. 43:12 (2016) 2271–2272.

LARANJO, Mafalda *et al.* - 2-Bromo-5-hydroxyphenylporphyrins for photodynamic therapy: Photosensitization efficiency, subcellular localization and in vivo studies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 10:1 (2013) 51–61.

LARMAS, Markku; SÁNDOR, George K. B. - Enzymes, Dentinogenesis and Dental Caries: a Literature Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Research**. 5:4 (2014) 3–3.

LAURENT, P.; CAMPS, J.; ABOUT, I. - Biodentine(TM) induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. **International endodontic journal**. 45:5 (2012) 439–48.

LAURENT, Patrick *et al.* - Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. **Dental materials**. 24:11 (2008) 1486–94.

LEE, D. H. *et al.* - Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. **Cell biology and toxicology**. 22:1 (2006) 39–46.

LEE, Li-Wan *et al.* - Clinical Outcomes for Teeth Treated with Electrospun Poly(ε-caprolactone) Fiber Meshes/Mineral Trioxide Aggregate Direct Pulp Capping. **Journal of Endodontics**. 41:5 (2015) 628–636.

LEE, Sun-Kyung *et al.* - Effect of calcium phosphate cements on growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. **Journal of endodontics**. 36:9 (2010) 1537–42.

LEE, Y. *et al.* - Immunohistochemical analysis of pulpal regeneration by nestin expression in replanted teeth. **International endodontic journal**. 45:7 (2012) 652–9.

LESSA, Fernanda Campos Rosetti *et al.* - Cytotoxic effects of white-MTA and MTA-Bio cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). **Brazilian Dental Journal**. 21:1 (2010) 24–31.

LEVIN, L. G. *et al.* - Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro. **European journal of oral sciences**. 107:2 (1999) 131–7.

LI, Yucheng *et al.* - Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF-β1. **Archives of Oral Biology**. 56:11 (2011) 1221–1229.

LI, Zhaofei *et al.* - Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. **Journal of endodontics**. 41:9 (2015) 1412–7.

LIBERATI, Alessandro - The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. **Annals of Internal Medicine**. 151:4 (2009) W.

LIN, Chia-Yung *et al.* - Zinc Chloride for Odontogenesis of Dental Pulp Stem Cells via Metallothionein Up-regulation. **Journal of Endodontics**. 37:2 (2011) 211–216.

LIN, Heng *et al.* - KLF4 promotes the odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**. 37:7 (2011) 948–954.

LIN, Jia-Cheng *et al.* - Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide for apexification of immature permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. **Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi**. 115:7 (2016) 523–30.

LINDE, A. - Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. **Connective tissue research**. 33:1–3 (1995) 163–70.

LINDE, A.; GOLDBERG, M. - Dentinogenesis. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 4:5 (1993) 679–728.

LINDE, A.; LUNDGREN, T. - From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. **The International journal of developmental biology**. 39:1 (1995) 213–22.

LINU, S. *et al.* - Treatment Outcome Following Direct Pulp Capping Using Bioceramic Materials in Mature Permanent Teeth with Carious Exposure: A Pilot Retrospective Study. **Journal of endodontics**. 43:10 (2017) 1635–1639.

LIU, Qian *et al.* - Demineralized bone matrix used for direct pulp capping in rats. **PloS one**. 12:3 (2017) e0172693.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. - Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 25:4 (2001) 402–8.

LODISH, H. *et al.* - **Molecular Cell Biology**. [S.l.] : W. H. Freeman, 2008. ISBN 10: 0-7167-3136-3.

LOISON-ROBERT, Ludwig Stanislas *et al.* - In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. **PLOS ONE**. 13:1 (2018) e0190014.

LOPEZ-CAZAUX, S. *et al.* - Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-

derived cells: technical note. **European cells & materials**. 11:2006) 35–42; discussion 42.

LU, Huai-En *et al.* - Selection of alkaline phosphatase-positive induced pluripotent stem cells from human amniotic fluid-derived cells by feeder-free system. **Experimental Cell Research**. 317:13 (2011) 1895–1903.

LU, Y. *et al.* - Histological evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide on human pulp tissue. **International Endodontic Journal**. 41:8 (2008) 643–650.

LUCZAJ-CEPOWICZ, Elzbieta *et al.* - Evaluation of cytotoxicity and pH changes generated by various dental pulp capping materials - an in vitro study. **Folia histochemica et cytobiologica**. 55:2 (2017) 86–93.

LUKINMAA, P. L.; WALTIMO, J. - Immunohistochemical Localization of Types I, V, and VI Collagen in Human Permanent Teeth and Periodontal Ligament. **Journal of Dental Research**. 71:2 (1992) 391–397.

LUNDQUIST, Patrik - Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis. **Swedish dental journal. Supplement**. 154 (2002) 1–52.

LUO, Zhirong *et al.* - Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. **Journal of dentistry**. 42:4 (2014) 490–7.

MAGLOIRE, H. *et al.* - Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. **Advances in dental research**. 15:2001) 46–50.

MAGLOIRE, H.; BOUVIER, M.; JOFFRE, A. - Odontoblast response under carious lesions. **Proceedings of the Finnish Dental Society. Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia**. 88 Suppl 1:1992) 257–74.

MAGNE, D. *et al.* - Development of an Odontoblast In Vitro Model to Study Dentin Mineralization. **Connective Tissue Research**. 45:2 (2004) 101–108.

MALKONDU, Özlem; KAZANDAG, Meriç Karapinar; KAZAZOGLU, Ender - A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. **BioMed Research International**. 2014:2014).

MAN, Jennifer *et al.* - Low-intensity Low-frequency Ultrasound Promotes Proliferation and Differentiation of Odontoblast-like Cells. **Journal of Endodontics**. 38:5 (2012) 608–613.

MARCIANO, Marina Angélica; DUARTE, Marco Antonio Hungaro; CAMILLERI, Josette - Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. **Clinical oral investigations**. 19:9 (2015) 2201–9.

MARCONYAK, Louis J. *et al.* - A Comparison of Coronal Tooth Discoloration Elicited by Various Endodontic Reparative Materials. **Journal of endodontics**. 42:3 (2016) 470–3.

MARQUES, Miguel Seruca; WESSELINK, Paul R.; SHEMESH, Hagay - Outcome of Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate: A Prospective Study. **Journal of endodontics**. 41:7 (2015) 1026–31.

MARTENS, L.; RAJASEKHARAN, S.; CAUWELS, R. - Pulp management after traumatic injuries with a tricalcium silicate-based cement (Biodentine™): a report of two cases, up to 48 months follow-up. **European Archives of Paediatric Dentistry**. 16:6 (2015) 491–496.

MASUDA *et al.* - Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. **Acta histochemica**. 112:5 (2010) 452–8.

MELIN, M. *et al.* - Effects of TGF 1 on Dental Pulp Cells in Cultured Human Tooth Slices. **Journal of Dental Research**. 79:9 (2000) 1689–1696.

MENTE, Johannes *et al.* - Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. **Journal of endodontics**. 36:5 (2010) 806–13.

MENTE, Johannes *et al.* - Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. **Journal of endodontics**. 40:11 (2014) 1746–51.

MILES, Jeffrey P. *et al.* - Pulp capping with mineral trioxide aggregate (MTA): a retrospective analysis of carious pulp exposures treated by undergraduate dental students. **Operative dentistry**. 35:1 (2010) 20–8.

MIN, Kyung-San *et al.* - Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. **Journal of endodontics**. 34:6 (2008) 666–70.

MIN, Kyung-San; YANG, Seong-Hak; KIM, Eun-Cheol - The combined effect of mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. **Journal of endodontics**. 35:6 (2009) 847–51.

MINAMIKAWA, Hajime *et al.* - Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**. 37:5 (2011) 637–641.

MJÖR, I. A.; SVEEN, O. B.; HEYERAAS, K. J. - Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. **Quintessence international**. 32:6 (2001) 427–46.

MOGHADDAME-JAFARI, Sasan *et al.* - Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and

proliferation in vitro. **Journal of endodontics**. 31:5 (2005) 387–91.

MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P. M. H. - Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **International Endodontic Journal**. 44:8 (2011) 697–730.

MOHER, David *et al.* - Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **International Journal of Surgery**. 8:5 (2010) 336–341.

MONTEIRO BRAMANTE, Clóvis *et al.* - Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**. 106:6 (2008) 909–13.

MORI, Graziela Garrido *et al.* - Biocompatibility Evaluation of Biodentine in Subcutaneous Tissue of Rats. **Journal of Endodontics**. 40:9 (2014) 1485–1488.

MORITZ, A. *et al.* - Advantages of a pulsed CO2 laser in direct pulp capping: a long-term in vivo study. **Lasers in surgery and medicine**. 22:5 (1998) 288–93.

MOŻYŃSKA, Joanna *et al.* - Tooth Discoloration Induced by Different Calcium Silicate-based Cements: A Systematic Review of In Vitro Studies. **Journal of endodontics**. 43:10 (2017) 1593–1601.

MURRAY, P. E. *et al.* - Odontoblast morphology and dental repair. **Journal of Dentistry**. 31:2003) 75–82.

MURRAY, Peter E.; GARCIA-GODOY, Franklin - Comparison of the clinical and preclinical biocompatibility testing of dental materials: are the ISO usage tests meaningful? **Journal of biomedical materials research. Part A**. 81:1 (2007) 51–8.

MURRAY, Peter E.; GARCÍA GODOY, Cristina; GARCÍA GODOY, Franklin - How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**. 12:3 (2007) E258-66.

NAIR, P. N. R. *et al.* - Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. **International endodontic journal**. 41:2 (2008) 128–50.

NAKASHIMA, Misako; IOHARA, Koichiro; SUGIYAMA, Masahiko - Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 20:5–6 (2009) 435–440.

NAWAREG, Manar M.Abu *et al.* - Adhesive sealing of dentin surfaces in vitro: A review. **American journal of dentistry**. 28:6 (2015) 321–32.

NEGM, M. M.; COMBE, E. C.; GRANT, A. A. - Reaction of the exposed pulps to new cements containing calcium hydroxide. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**. 51:2 (1981) 190–204.

NICOLAIJE, Claudia; KOEDAM, Marijke; LEEUWEN, Johannes P. T. M. VAN - Decreased oxygen tension lowers reactive oxygen species and apoptosis and inhibits osteoblast matrix mineralization through changes in early osteoblast differentiation. **Journal of cellular physiology**. 227:4 (2012) 1309–18.

NICOLAIJE, Claudia; PEPPEL, Jeroen VAN DE; LEEUWEN, Johannes P. T. M. VAN - Oxygen-induced transcriptional dynamics in human osteoblasts are most prominent at the onset of mineralization. **Journal of cellular physiology**. 228:9 (2013) 1863–72.

NIKFARJAM, Frangis *et al.* - Influence of Biodentine® - A Dentine Substitute - On Collagen Type I Synthesis in Pulp Fibroblasts In Vitro. **PloS one**. 11:12 (2016) e0167633.

NIÑO-BARRERA, Javier L.; GUTIÉRREZ, María L.; GARZÓN-ALVARADO, Diego A. - A theoretical model of dentinogenesis: Dentin and dentinal tubule formation. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**. 112:1 (2013) 219–227.

NIU, Li-Na *et al.* - A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. **Journal of dentistry**. 42:5 (2014) 517–33.

NOWICKA, Alicja *et al.* - Response of Human Dental Pulp Capped with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**. 39:6 (2013) 743–747.

NOWICKA, Alicja *et al.* - Tomographic Evaluation of Reparative Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and Dentin Bonding System in Human Teeth. **Journal of Endodontics**. 41:8 (2015) 1234–1240.

NOWICKA, Alicja *et al.* - Clinical and Histological Evaluation of Direct Pulp Capping on Human Pulp Tissue Using a Dentin Adhesive System. **BioMed Research International**. 2016:2016) 1–9.

NOZAKI, Tadashige *et al.* - Differentiation of Rat Dental Pulp-derived Cells into an Osteoblastic Lineage. **Oral Science International**. 2:2 (2005) 118–125.

NUÑEZ, Camila M. *et al.* - Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. **Journal of endodontics**. 40:3 (2014) 406–11.

O'CONNOR, Michael D. *et al.* - Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**. 26:5 (2008) 1109–1116.

O'SULLIVAN, J. M.; COOK, G. J. R. - A review of the efficacy of bone scanning in prostate and breast cancer. **The quarterly journal of nuclear medicine**. 46:2 (2002) 152–9.

ODABAŞ, Mesut Enes; BANI, Mehmet; TIRALI, Resmiye Ebru - Shear Bond Strengths of Different Adhesive Systems to Biodentine. **The Scientific World Journal**. 2013:2013) 1–5.

OKIJI, Takashi; YOSHIBA, Kunihiko - Reparative Dentinogenesis Induced by Mineral Trioxide Aggregate: A Review from the Biological and Physicochemical Points of View. **International Journal of Dentistry**. 2009:2009) 1–12.

OLGART, L. - Neural control of pulpal blood flow. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 7:2 (1996) 159–71.

OLIVI, G. *et al.* - Pulp capping: advantages of using laser technology. **European journal of paediatric dentistry**. 8:2 (2007) 89–95.

OLSSON, H. *et al.* - Dental pulp capping: effect of Emdogain Gel on experimentally exposed human pulps. **International Endodontic Journal**. 38:3 (2005) 186–194.

OLSSON, H.; PETERSSON, K.; ROHLIN, M. - Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. **International endodontic journal**. 39:6 (2006) 429–42.

OPDAM, N. J. M. *et al.* - Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. **Journal of dental research**. 93:10 (2014) 943–9.

ORCHARDSON, R.; CADDEN, S. W. - An update on the physiology of the dentine-pulp complex. **Dental update**. 28:4 (2001) 200–6, 208–9.

OSYCZKA, Anna M. *et al.* - Different Effects of BMP-2 on Marrow Stromal Cells from Human and Rat Bone. **Cells Tissues Organs**. 176:1–3 (2004) 109–119.

PAMEIJER, C. H.; STANLEY, H. R. - The disastrous effects of the «total etch» technique in vital pulp capping in primates. **American journal of dentistry**. 11 Spec No:1998) S45-54.

PAPAZISIS, K. T. *et al.* - Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of immunological methods**. 208:2 (1997) 151–8.

PARANJPE, Avina *et al.* - Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**. 37:12 (2011) 1691–1695.

PARANJPE, Avina; ZHANG, Hai; JOHNSON, James D. - Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. **Journal of endodontics**. 36:6 (2010) 1042–7.

PARIROKH, Masoud; TORABINEJAD, Mahmoud - Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. **Journal of Endodontics**. 36:1 (2010) 16–27.

PARIROKH, Masoud; TORABINEJAD, Mahmoud - Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. **Journal of Endodontics**. 36:3 (2010) 400–413.

PARK, Su-Jung *et al.* - Odontogenic effect of a fast-setting pozzolan-based pulp capping material. **Journal of endodontics**. 40:8 (2014) 1124–31.

PAROLIA, A. *et al.* - A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. **Australian dental journal**. 55:1 (2010) 59–64.

PARTHASARATHY, Ambalavanan *et al.* - Histological response of human pulps capped with calcium hydroxide and a self-etch adhesive containing an antibacterial component. **Journal of conservative dentistry**. 19:3 (2016) 274–9.

PASHLEY, D. H. - Dynamics of the pulpo-dentin complex. **Critical reviews in oral biology and medicine**. 7:2 (1996) 104–33.

PATERSON, R. C.; RADFORD, J. R.; WATTS, A. - The response of the rat molar pulp of two proprietary calcium hydroxide preparations. **British dental journal**. 151:6 (1981) 184–6.

PAUL, H.; REGINATO, A. J.; SCHUMACHER, H. R. - Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. **Arthritis and rheumatism**. 26:2 (1983) 191–200.

PAULO, Siri Folques Vicente De - **Biosfonatos como agentes de osteonecrose maxilar: estudo dos mecanismos fisiopatológicos**. [S.l.] : Universidade de Coimbra, 2015

PENG, Weiwei *et al.* - Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **Journal of endodontics**. 37:9 (2011) 1240–6.

PÉRARD, Matthieu *et al.* - Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 24:6 (2013) 1527–1534.

PEREIRA, Saniva Aparecida De Lima *et al.* - Pulp reactions in human teeth capped with self-etching or total-etching adhesive systems. **Quintessence international**. 40:6 (2009) 491–6.

PERINPANAYAGAM, Hiran - Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. **Journal Canadian Dental Association**. 75:5 (2009) 369–72.

PERVAIZ, Shazib; CLEMENT, Marie-Veronique - Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species? **The international journal of biochemistry & cell biology**. 39:7–8 (2007) 1297–

304.

PEUMANS, M. *et al.* - Clinical effectiveness of contemporary adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions. A systematic review. **Dental materials**. 30:10 (2014) 1089–103.

POGGIO, C. *et al.* - Biocompatibility of a new pulp capping cement. **Annali di stomatologia**. 5:2 (2014) 69–76.

POGGIO, Claudio *et al.* - Cytocompatibility and Antibacterial Properties of Capping Materials. **The Scientific World Journal**. 2014:2014) 1–10.

PRATI, Carlo; GANDOLFI, Maria Giovanna - Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. **Dental materials**. 31:4 (2015) 351–70.

PROOST, Ian DE *et al.* - Functional Live Cell Imaging of the Pulmonary Neuroepithelial Body Microenvironment. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. 39:2 (2008) 180–189.

QUDEIMAT, M. A.; BARRIESHI-NUSAIR, K. M.; OWAIS, A. I. - Calcium hydroxide vs mineral trioxide aggregates for partial pulpotomy of permanent molars with deep caries. **European archives of paediatric dentistry**. 8:2 (2007) 99–104.

RAHMAN, Saeed Ur *et al.* - The Prolyl Hydroxylase Inhibitor Dimethyloxalyglycine Enhances Dentin Sialophosphoprotein Expression through VEGF-Induced Runx2 Stabilization. **PLoS ONE**. 9:11 (2014) e112078.

RAJASEKHARAN, S. *et al.* - Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a review of the literature. **European Archives of Paediatric Dentistry**. 15:3 (2014) 147–158.

RAMOS, João Carlos Tomás - **Protecções pulpares directas : avaliação histopatológica**. [S.l.] : Universidade de Coimbra, 2008

RANLY, Don M. *et al.* - Osteocalcin expression in young and aged dental pulps as determined by RT-PCR. **Journal of Endodontics**. 23:6 (1997) 374–377.

RASARATNAM, Lakshmi - Review suggests direct pulp capping with MTA more effective than calcium hydroxide. **Evidence-based dentistry**. 17:3 (2016) 94–95.

RATHE, Florian *et al.* - The Effect of Enamel Matrix Derivative (Emdogain®) on Bone Formation: A Systematic Review. **Tissue Engineering Part B: Reviews**. 15:3 (2009) 215–224.

RATHINAM, Elanagai *et al.* - Gene Expression Profiling and Molecular Signaling of Dental Pulp Cells in Response to Tricalcium Silicate Cements: A Systematic Review. **Journal of**

Endodontics. 41:11 (2015) 1805–1817.

RATHVA, Vandana - Enamel matrix protein derivatives: role in periodontal regeneration. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry.** 2011) 79.

REIS, Alessandra *et al.* - Does the adhesive strategy influence the post-operative sensitivity in adult patients with posterior resin composite restorations?: A systematic review and meta-analysis. **Dental materials.** 31:9 (2015) 1052–67.

REYES-CARMONA, Jessie F. *et al.* - In Vivo Host Interactions with Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide: Inflammatory Molecular Signaling Assessment. **Journal of Endodontics.** 37:9 (2011) 1225–1235.

REYES-CARMONA, Jessie F.; FELIPPE, Mara S.; FELIPPE, Wilson T. - Biomineralization Ability and Interaction of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement With Dentin in a Phosphate-containing Fluid. **Journal of Endodontics.** 35:5 (2009) 731–736.

RIBEIRO, Caroline Sousa *et al.* - The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.** 109:6 (2010) e109–e112.

ROBERTS, H. *et al.* - Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. **Dental Materials.** 24:2 (2008) 149–164.

RÔÇAS, Isabela N.; SIQUEIRA, José F. - Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. **Journal of endodontics.** 37:2 (2011) 143–50.

ROCHA, Alejandra Citlalli Rodríguez *et al.* - Physicochemical analysis of MTA Angelus® and Biodentine® conducted with X ray diffraction, dispersive energy spectrometry, X ray fluorescence, scanning electron microscope and infra red spectroscopy. **Revista Odontológica Mexicana.** 19:3 (2015) e170–e176.

ROSA, Wellington L. O. DA *et al.* - Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials.** 2017).

ROSENBERG, Linda *et al.* - Observational: prospective study of indirect pulp treatment in primary molars using resin-modified glass ionomer and 2% chlorhexidine gluconate: a 12-month Follow-up. **Pediatric dentistry.** 35:1 ([s.d.]) 13–7.

ROSSI, Andiara DE *et al.* - Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. **Journal of endodontics.** 40:9 (2014)

1362–9.

RUCH, J. V - Odontoblast commitment and differentiation. **Biochemistry and cell biology** = **Biochimie et biologie cellulaire**. 76:6 (1998) 923–38.

RYTER, Stefan W.; CHOI, Augustine M. K. - Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. **Antioxidants & redox signaling**. 7:1–2 (2005) 80–91.

SAGHIRI, Mohammad Ali *et al.* - Radiopacifier particle size impacts the physical properties of tricalcium silicate-based cements. **Journal of endodontics**. 41:2 (2015) 225–30.

SAGHIRI, Mohammad Ali *et al.* - Calcium silicate-based cements and functional impacts of various constituents. **Dental materials journal**. 36:1 (2017) 8–18.

SALEHI, Satin *et al.* - Dentin matrix components extracted with phosphoric acid enhance cell proliferation and mineralization. **Dental Materials**. 32:3 (2016) 334–342.

SANDE, F. H. VAN DE *et al.* - Patient risk factors' influence on survival of posterior composites. **Journal of dental research**. 92:7 Suppl (2013) 78S–83S.

SANGWAN, P. *et al.* - Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: A review of proposed mechanisms. **International Endodontic Journal**. 46:1 (2013) 3–19.

SANTUCCI, P. J. - Dycal versus Nd:YAG laser and Vitrebond for direct pulp capping in permanent teeth. **Journal of clinical laser medicine & surgery**. 17:2 (1999) 69–75.

SASAKI, Takahisa; GARANT, Philius R. - Structure and organization of odontoblasts. **The Anatomical Record**. 245:2 (1996) 235–249.

SAWICKI, Leszek *et al.* - Histological evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide in direct pulp capping of human immature permanent teeth. **American journal of dentistry**. 21:4 (2008) 262–6.

SAWYER, Allen N. *et al.* - Effects of Calcium Silicate-based Materials on the Flexural Properties of Dentin. **Journal of Endodontics**. 38:5 (2012) 680–683.

SCHEVEN, B. A. *et al.* - VEGF and odontoblast-like cells: Stimulation by low frequency ultrasound. **Archives of Oral Biology**. 54:2 (2009) 185–191.

SCHUURS, A. H.; GRUYTHUYSEN, R. J.; WESSELINK, P. R. - Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. **Endodontics & dental traumatology**. 16:6 (2000) 240–50.

SEMEGHINI, Mayara Sgarbi *et al.* - In vitro evaluation of the odontogenic potential of mouse

undifferentiated pulp cells. **Brazilian dental journal**. 23:4 (2012) 328–36.

SEPTODONT RESEARCH DEPARTMENT - Safety Data Sheet (Ec Regulation nº 1907/2006). **Biodentine Liquid and power RD94-B**. 2009) 1–12.

SHAHANI, M. N.; SUBBA, V. V - Comparison of antimicrobial substantivity of root canal irrigants in instrumented root canals up to 72 h: an in vitro study. **Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**. 29:1 (2011) 28–33.

SHAHRAVAN, A. *et al.* - A histological study of pulp reaction to various water/powder ratios of white mineral trioxide aggregate as pulp-capping material in human teeth: a double-blinded, randomized controlled trial. **International endodontic journal**. 44:11 (2011) 1029–33.

SHAYEGAN, Amir *et al.* - Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. **Pediatric dentistry**. 34:7 (2012) e202-8.

SHIE, Ming-You *et al.* - The Effect of a Physiologic Solution pH on Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**. 35:1 (2009) 98–101.

SHIMA, Hidehito *et al.* - Regenerative capability of dental pulp cells after crown fracture. **Dental traumatology**. 29:1 (2013) 29–33.

SHIMAZU, Yoshihito; NANJI, Antonio; AOBA, Takaaki - Immunodetection of Osteopontin at Sites of Resorption in the Pulp of Rat Molars. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 50:7 (2002) 911–921.

SHU, Z. *et al.* - pH-dependent changes of nitric oxide, peroxynitrite, and reactive oxygen species in hepatocellular damage. **The American journal of physiology**. 273:5 Pt 1 (1997) G1118-26.

SILVA *et al.* - The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. **International endodontic journal**. 39:4 (2006) 309–16.

SILVA, E. J. N. L. *et al.* - Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. **International endodontic journal**. 49:6 (2016) 574–80.

SILVA, G. *et al.* - Direct pulp capping with a dentin bonding system in human teeth: a clinical and histological evaluation. **Operative dentistry**. 31:3 (2006) 297–307.

SILVA, Gerluzia Aparecida Borges *et al.* - Subclinical Failures of Direct Pulp Capping of Human Teeth by Using a Dentin Bonding System. **Journal of Endodontics**. 39:2 (2013) 182–189.

SILVA, Lea Assed Bezerra *et al.* - Furcation Perforation: Periradicular Tissue Response to Biodentine as a Repair Material by Histopathologic and Indirect Immunofluorescence Analyses.

Journal of endodontics. 43:7 (2017) 1137–1142.

SIMON, S. *et al.* - Molecular characterization of young and mature odontoblasts. **Bone.** 45:4 (2009) 693–703.

SIMON R., Cherry; SORENSON, James A.; PHELPS, Michael E. - **Physics in Nuclear Medicine.** 4th Editio ed. [S.l.] : Elsevier Saunders, 2003. ISBN 1416051988.

SINGH, Upinder *et al.* - Novel Live Alkaline Phosphatase Substrate for Identification of Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports.** 8:3 (2012) 1021–1029.

SLIM, Karem *et al.* - Methodological index for non-randomized studies (minors): development and validation of a new instrument. **ANZ journal of surgery.** 73:9 (2003) 712–6.

SMITH *et al.* - Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. **Advances in dental research.** 15:2001) 51–4.

SMITH, A. J. *et al.* - Reactionary dentinogenesis. **The International journal of developmental biology.** 39:1 (1995) 273–80.

SMITH, A. J. J. *et al.* - Dentine as a bioactive extracellular matrix. **Archives of Oral Biology.** 57:2 (2012) 109–121.

SMITH, A. J.; LESOT, H. - Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? **Critical reviews in oral biology and medicine.** 12:5 (2001) 425–37.

SMITH, J. G. *et al.* - Recruitment of dental pulp cells by dentine and pulp extracellular matrix components. **Experimental Cell Research.** 318:18 (2012) 2397–2406.

SONG, Minju *et al.* - A Randomized Controlled Study of the Use of ProRoot Mineral Trioxide Aggregate and Endocem as Direct Pulp Capping Materials. **Journal of Endodontics.** 41:1 (2015) 11–15.

SONG, Minju *et al.* - Clinical and Molecular Perspectives of Reparative Dentin Formation. **Dental Clinics of North America.** 61:1 (2017) 93–110.

SOUZA COSTA, C. A. DE *et al.* - Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. **Dental materials.** 17:3 (2001) 230–40.

SRISUWAN, T. *et al.* - Survival of rat functional dental pulp cells in vascularized tissue engineering chambers. **Tissue & cell.** 44:2 (2012) 111–21.

STANLEY, H. R. - Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping

studies. **American journal of dentistry**. 11 Spec No:1998) S17-34.

STAQUET, M. J. *et al.* - Expression and localisation of αv integrins in human odontoblasts. **Cell and Tissue Research**. 323:3 (2006) 457–463.

STASHENKO, P. *et al.* - Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**. 78:4 (1994) 494–502.

STEFFEN, R.; WAES, H. VAN - Understanding mineral trioxide aggregate/Portland-cement: a review of literature and background factors. **European archives of paediatric dentistry**. 10:2 (2009) 93–7.

STERNE, J. A. C. *et al.* - Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. **BMJ**. 343:jul22 1 (2011) d4002–d4002.

STERNE, J. A.; EGGGER, M. - Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis. **Journal of clinical epidemiology**. 54:10 (2001) 1046–55.

SÜBAY, R. K.; AŞCI, S. - Human pulpal response to hydroxyapatite and a calcium hydroxide material as direct capping agents. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**. 76:4 (1993) 485–92.

SUMER, Mahmut *et al.* - Reactions of Connective Tissue to Amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Chlorhexidine. **Journal of Endodontics**. 32:11 (2006) 1094–1096.

SUN, Z. L. *et al.* - Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. **Connective tissue research**. 37:3–4 (1998) 251–61.

SWARUP, S. J. *et al.* - Pulpal response to nano hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide when used as a direct pulp capping agent: an in vivo study. **The Journal of clinical pediatric dentistry**. 38:3 (2014) 201–6.

SYED, Meena; CHOPRA, Radhika; SACHDEV, Vinod - Allergic Reactions to Dental Materials-A Systematic Review. **Journal of clinical and diagnostic research**. 9:10 (2015) ZE04-9.

TAKEDA, T. *et al.* - Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. **Journal of dental research**. 87:7 (2008) 676–81.

TANALP, Jale *et al.* - Comparison of the radiopacities of different root-end filling and repair materials. **TheScientificWorldJournal**. 2013:2013) 594950.

TANG, Jia; SAITO, Takashi - Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. **BioMed Research International**. 2015:2015) 1–8.

TARPEY, M. M. - Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 286:3 (2004) 431R–444.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. - Reactive oxygen species in cell signaling. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**. 279:6 (2000) L1005-28.

TONOMURA, Akiko *et al.* - Differential Inducibility of Human and Porcine Dental Pulp-Derived Cells into Odontoblasts. **Connective Tissue Research**. 48:5 (2007) 229–238.

TORABINEJAD, M. *et al.* - Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**. 21:7 (1995) 349–353.

TORABINEJAD, Mahmoud; PARIROKH, Masoud - Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. **Journal of Endodontics**. 36:2 (2010) 190–202.

TORABINEJAD M, Parirokh M. - Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - part II: Leakage and biocompatibility investigations. **Journal of Endodontics**. 36:2 (2010) 190–202.

TORABINEJAD M, White DJ - Tooth filling material and use. US. Patent Number. 1995) 5,769,638.

TRAN, X. V. *et al.* - Effect of a Calcium-silicate-based Restorative Cement on Pulp Repair. **Journal of Dental Research**. 91:12 (2012) 1166–1171.

TROWBRIGDE, H.; KIM, S.; SUDA, H. - Pulp development, structure and function. **Em Pathways of the pulp**. 8th editio ed. [S.l.] : Mosby, 2001. ISBN 978-0815186137. p. 411–455.

TÜZÜNER, T. *et al.* - Clinical and radiographic outcomes of direct pulp capping therapy in primary molar teeth following haemostasis with various antiseptics: a randomised controlled trial. **European journal of paediatric dentistry**. 13:4 (2012) 289–92.

TZIAFA, Christina *et al.* - Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. **Journal of endodontics**. 40:12 (2014) 1967–71.

TZIAFA, Christina *et al.* - Dentinogenic Activity of Biodentine in Deep Cavities of Miniature Swine Teeth. **Journal of Endodontics**. 41:7 (2015) 1161–1166.

TZIAFAS, D. - Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review.

International endodontic journal. 27:2 (1994) 61–74.

TZIAFAS, D. - Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. **The International journal of developmental biology.** 39:1 (1995) 281–90.

TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. - Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **Journal of dentistry.** 28:2 (2000) 77–92.

UNDA, Fernando-Jos *et al.* - Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGF β 1. **Developmental Dynamics.** 218:3 (2000) 480–489.

VALKO, Marian *et al.* - Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology.** 39:1 (2007) 44–84.

VALLÉS, Marta *et al.* - Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. **Journal of endodontics.** 39:4 (2013) 525–8.

VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim - Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols.** 1:3 (2006) 1112–1116.

VISTICA, D. T. *et al.* - Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer research.** 51:10 (1991) 2515–20.

VOIGT, Wieland - Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. Em **Chemosensitivity.** New Jersey : Humana Press, 2005. ISBN 978-1-58829-345-9v. 110. p. 039–048.

WANG, Y. *et al.* - Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF- κ B pathway. **Oral diseases.** 20:7 (2014) 650–8.

WANG Y, Zhao S. - **Vascular Biology of the Placenta.** [S.l.] : Morgan & Claypool Life Sciences, 2010

WATAHA, J. C. - Principles of biocompatibility for dental practitioners. **The Journal of prosthetic dentistry.** 86:2 (2001) 203–9.

WATSON, Timothy F. *et al.* - Present and future of glass-ionomers and calcium-silicate cements as bioactive materials in dentistry: Biophotonics-based interfacial analyses in health and disease. **Dental Materials.** 30:1 (2014) 50–61.

WATTS, A.; PATERSON, R. C. - A comparison of pulp responses to two different materials in the dog and the rat. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.** 52:6 (1981) 648–

52.

WATTS, A.; PATERSON, R. C. - Bacterial contamination and the «toxicity» of materials to the exposed pulp. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**. 56:5 (1983) 542–8.

WATTS, J.Dustin *et al.* - Effects of pH and Mixing Agents on the Temporal Setting of Tooth-colored and Gray Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**. 33:8 (2007) 970–973.

WEI, Wei *et al.* - Effects of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement on the Viability of Murine Odontoblast-like Cells. **Journal of Endodontics**. 38:7 (2012) 936–942.

WELLINGTON, Luiz De Oliveira Da Rosa *et al.* - Could the application of bioactive molecules improve vital pulp therapy success? A systematic review. **Journal of biomedical materials research. Part A**. 105:3 (2017) 941–956.

WIESEN, Robert M. *et al.* - The expression of periostin in dental pulp cells. **Archives of Oral Biology**. 60:5 (2015) 760–767.

WLODKOWIC, Donald *et al.* - Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods in cell biology**. 103:2011) 55–98.

WUNDER, J. A.; BRINER, W. W.; CALKINS, G. P. - Identification of the cultivable bacteria in dental plaque from the beagle dog. **Journal of dental research**. 55:6 (1976) 1097–102.

YAMAMOTO, R.; OIDA, S.; YAMAKOSHI, Y. - Dentin Sialophosphoprotein—derived Proteins in the Dental Pulp. **Journal of Dental Research**. 94:8 (2015) 1120–1127.

YANG, In-Seok *et al.* - Tertiary Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Odontogenic Ameloblast-associated Protein in Rat Teeth. **Journal of Endodontics**. 36:12 (2010) 1956–1962.

YASUDA, Y. *et al.* - Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. **Journal of Oral Rehabilitation**. 35:12 (2008) 940–946.

YASUDA, Yoshiyuki *et al.* - The Effect of Mineral Trioxide Aggregate on the Mineralization Ability of Rat Dental Pulp Cells: An In Vitro Study. **Journal of Endodontics**. 34:9 (2008) 1057–1060.

YAZDANFAR, Iraj; GUTKNECHT, Norbert; FRANZEN, Rene - Effects of diode laser on direct pulp capping treatment. **Lasers in Medical Science**. 30:4 (2015) 1237–1243.

ZANINI, Marjorie *et al.* - Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **Journal of endodontics**. 38:9 (2012) 1220–6.

ZARRABI, Mohammad Hassan *et al.* - Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. **Journal of endodontics**. 36:11 (2010) 1778–81.

ZHANG, Y.; WANG, Y. - Distinct photopolymerization efficacy on dentin of self-etch adhesives. **Journal of dental research**. 91:8 (2012) 795–9.

ZHANG, Ying; WANG, Yong - Effect of application mode on interfacial morphology and chemistry between dentine and self-etch adhesives. **Journal of dentistry**. 41:3 (2013) 231–40.

ZHAO, Xiu *et al.* - Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. **Molecular biology reports**. 39:1 (2012) 215–20.

ZHOU, Hui-min *et al.* - In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Novel Root Repair Material. **Journal of Endodontics**. 39:4 (2013) 478–483.

ZHU, Chenxi; JU, Bin; NI, Rong - Clinical outcome of direct pulp capping with MTA or calcium hydroxide: a systematic review and meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**. 8:10 (2015) 17055–60.

ZMENER, Osvaldo; PAMEIJER, Cornelis H.; BANEGAS, Gladys - An in vitro study of the pH of three calcium hydroxide dressing materials. **Dental traumatology**. 23:1 (2007) 21–5.

ZOLLE, I. - **Technetium-99m Pharmaceuticals Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine**. 1st editio ed. [S.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2006. ISBN 3-540-33989-2.

ZURICK, Kevin M.; QIN, Chunlin; BERNARDS, Matthew T. - Mineralization induction effects of osteopontin, bone sialoprotein, and dentin phosphoprotein on a biomimetic collagen substrate. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 101A:6 (2013) 1571–1581.

PARTE VI — SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS

A	Agregados
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
<i>ALP</i>	<i>Alkaline phosphatase gene</i>
AiQ	Amplitude inter-quartil
An V	Anexina V
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARS	<i>Alizarin Red S - 3,4-Dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonic acid sodium salt</i>
Bi_2O_3	Fórmula química óxido de bismuto
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>
Ca^{2+}	Iões cálcio
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Fórmula química do hidróxido de cálcio
CaCO_3	Fórmula química carbonato de cálcio
$3\text{CaO}.\text{SiO}_2$	Fórmula química silicato tricálcico)
$2\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3$	Fórmula química aluminato tricálcico
3CaO	Fórmula química óxido tricálcico
$4\text{CaO}.\text{Al}_2\text{O}_3\text{Fe}_2\text{O}_3$	Fórmula química tetracálcico aluminoférrico
cDNA	<i>Complementar desoxyribonucleic acid</i>
CO_2	Fórmula química do dióxido de carbono
CO_3^{2-}	Fórmula química do carbonato
CS	<i>Cohort study</i>
DAB	<i>diamino-3,3'benzidine</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-fenilindol</i>
DCFH ₂ -DA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
DCFH	<i>2',7'-diclorodihidrofluoresceína</i>
DCF	<i>2',7'-diclorofluoresceína</i>
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient mixture F-12</i>
DMP-1	<i>Dentin matrix protein 1</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina
DPP	<i>Dentin phosphoprotein</i>
DSP	<i>Dentin sialoprotein</i>
<i>DSPP</i>	<i>Dentin sialophosphoprotein gene</i>
ECM	<i>Endoplasmic reticulum membrane protein complex</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EMD	<i>Enamel matrix derivative</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Federal and Drug Administration</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Isotiocianato de fluoresceína</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
HEMA	<i>Hydroxyethyl methacrylate</i>
H&E	Coloração de hematoxilina eosina
HMDP	Hidroximetileno difosfonato
ICs	Intervalos de confiança
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Imunoglobulinas G
IL	<i>Interleukine</i>
IP	Iodeto de propídeo
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,18,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide</i>

KCl	<i>Fórmula química</i> cloreto de potássio
keV	<i>Kiloelectron volt</i>
KH ₂ PO ₄	Fórmula química hidrogenofosfato de potássio
M	Monómeros
MBq	<i>MegaBecquerel</i>
MDPC-23	<i>Mouse dental papilla cell -23</i>
MEPE	<i>Matrix extracelular phosphoglycoprotein</i>
MIF	Média de intensidade de fluorescência
MINORS	<i>Methodological Index for Non-Randomized Studies</i>
MNLs	<i>Mononuclear leucocytes</i>
Mo	Molibdênio
MTA	<i>Mineral trioxide aggregate</i>
MTT	<i>Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio</i>
NaCl	Fórmula química cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fórmula química hidrogenofosfato de sódio
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
OCN	<i>Osteocalcin</i>
ORs	<i>Odds ratios</i>
OH ⁻	Ião hidroxilo
OPN	<i>Osteopontin</i>
<i>OPN</i>	<i>Osteopontin gene</i>
ON	<i>Osteonectin</i>
ORBEA	Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PICO	<i>Patient Intervention Comparison Outcomes</i>
PMNLs	<i>Polymorphonuclear leucocytes — PMNLs</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>

PSCs	<i>Pluripotent stem cells</i>
PVC	<i>Polyvinyl Chloride</i>
RCT	<i>Randomized controlled trial</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RLRs	<i>RIG-I-like receptors</i>
RNA _m	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
ROIs	<i>Regions of interest</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
<i>Runx2</i>	<i>Runt-related transcription factor 2 gene</i>
SIBLINGs	<i>Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins</i>
SiO ₂	Fórmula química óxido de silicato
SLRP	<i>Small leucine-rich proteoglycan</i>
<i>SRB</i>	Sulforrodamina B
Ta	<i>Tântalo</i>
Tc	Tecnésio
TEGMA	<i>Triethylene glycol dimethacrylate</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor alfa</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis fator alpha</i>
U.V.	Ultra-Violeta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

PARTE VII — ANEXOS

ANEXO I – Materiais utilizados

Material utilizado	Lote	Data de validade	Marca Comercial
Biodentine™	LOT B05574	2014-04	Septodont
	LOT B08323	2014-11	
	LOT B10221	2015-09	
	LOT B12265	2016-04	
	LOT B14676	2016-07	
	LOT B13380	2016-09	
Life®	LOT 4989034	2015-09	Kerr
	LOT 4954566	2015-09	
	LOT 4974378	2015-09	
	LOT 5598117	2017-06	
WhiteProRoot® MTA	LOT 12002493	2015/05	Dentply
	LOT 201404-01	2016-08	
	LOT 13102907	2016-11	
	LOT 13102906	2016-11	
Ketac Fil	LOT 496854	2015-12	3M ESPE
Corsodyl Care	LOT 000438	2013-09	GlaxoSmithKline
Hipoclorito de Sódio	LOT 031112	2014/11	DentaFlux

ANEXO II – Aprovação da Orbea / DGVA

PARECER 7/2015

Título do projeto: Estudo dos efeitos citotóxicos e na dentinogénese reparadora induzidos por um novo material em protecções pulpares directas

Investigador Responsável: Maria Filomena Rabaça Roque Botelho

O Órgão para o Bem Estar Animal – ORBEA, do Biotério IBILI – Sub-Unidade I da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, após análise do projeto acima mencionado, deu o seu parecer favorável.

Coimbra, 24 de Julho de 2015

A Diretora do Estabelecimento

Maria Filomena Rabaça Botelho

A Veterinária Designada

Luís Manuel Guiso Rios

ANEXO III— Aprovação da Comissão de Ética



FMUC - FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMISSÃO DE ÉTICA DA FMUC

Of. Refª 005-CE-2014

Data 24/02/2014

C/C aos Bons Senhores
Investigadores e co-investigadores

Exmo Senhor
Prof. Doutor Joaquim Neto Murta
Director da Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra

Assunto: Pedido de parecer à Comissão de Ética - Projecto de Investigação autónoma (refª CE-006/2014).

Investigador(a) Principal: Eunice Carrilho, Marla Filomona Botelho, Anabela Baptista Pereira Paula, Margarida Abrantes e Mafalda Laranjo.

Título do Projecto: "Testes de citotoxicidade celular com materiais dentários".

A Comissão de Ética da Faculdade de Medicina, após análise do projecto de investigação supra identificada, decidiu emitir o parecer que a seguir se transcreve: "**Parecer Favorável**".

Queira aceitar os meus melhores cumprimentos,

O Presidente,

Prof. Doutor João Manuel Pedrosa de Lima

GC

SERVÇOS TÉCNICOS DE APOIO À GESTÃO - STAG - COMISSÃO DE ÉTICA

Pólo das Ciências da Saúde - Unidade Central

Avenida do Saco Coimbr. Celas, 3000-351 COIMBRA - PORTUGAL

Tel: +351 239 657 707 (Ext. 542707) | Fax: +351 239 623 236

E-mail: comissaoetica@fmuc.ucp.pt | www.fmed.ucp.pt

