

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Caracterização físico-mecânica e biológica de
cimentos experimentais à base de MTA para o
complexo dentino-pulpar**

Raquel Venâncio Fernandes Dantas

Pelotas, 2011

Raquel Venâncio Fernandes Dantas

**Caracterização físico-mecânica e biológica de cimentos
experimentais à base de MTA para o complexo dentino-pulpar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área do conhecimento: Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Flávio F. Demarco

Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Henrique Zanchi

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco (orientador)

Prof.^a Dr.^a Fernanda Geraldés Pappen

Prof. Dr. Luciano Casagrande

Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes (Suplente)

DEDICATÓRIA

*Dedico a realização deste trabalho,
Aos meus pais, Cristovam (em memória) e Eunice
Por todo amor, educação, sabedoria
e apoio em todos os momentos.
A minha irmã Ruth, que amo intensamente.
Ao meu marido Hugo, pelo amor e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

“Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-las a despeito de todas as dificuldades e obstáculos... Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa.”

Autor desconhecido

Neste momento tão oportuno, quero expressar minha gratidão a cada pessoa que contribuiu para tornar meu sonho realidade.

Por início, quero agradecer a **Deus** por seu infinito amor. Agradecer por Tê-lo presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai **Cristovam** Fernandes Dantas (em memória), paiinho, como sua falta me dói, só tenho a agradecer todos os momentos que pude viver ao seu lado. A sua retidão e caráter é exemplo para mim. Você é o meu amor maior. Agradeço a Deus por ter me escolhido para ser sua filha.

*“Nem sei porque você se foi
Quantas saudades eu senti
E de tristezas vou viver
E aquele adeus, não pude dar
Você marcou em minha vida”*

Édson Trindade (interpretada por Tim Maia)

A minha mãe **Eunice** Maria Fernandes, joia mais preciosa que tenho. Agradeço infinitamente o seu amor, paciência, ensinamentos, incentivo, apoio...és um orgulho para mim.

A minha irmã **Ruth** Venâncio Fernandes Dantas, a melhor irmã do mundo. Agradeço por todos os momentos de partilha, amor e cumplicidade. Eu amo você.

Ao meu esposo **Hugo** Ramalho Sarmento, meu alicerce, companheiro, amigo, exemplo de ser humano. Muito obrigada por todos os momentos vividos. Você é tudo pra mim.

A minha **família** e **amigos** que torcem sempre pelas minhas conquistas.

Ao meu orientador **Flávio** Fernando Demarco, um exemplo de vida. Uma pessoa indescritível, mais que amigo, um pai. Nunca esquecerei tudo que fizestes por mim. A família Demarco/Tarquínio estará no meu coração onde quer que eu esteja.

Ao meu co-orientador Cesar Henrique Zanchi (**Tino**) por toda ajuda e confiança. Muito obrigada.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da UFPel, meus sinceros agradecimentos pelo acolhimento dos professores, funcionários e colegas. Em especial, quero agradecer a Josi, Thaize e Tati, pela compreensão e atenção.

Ao professor **Maximiliano** Sérgio Cenci, pela atenção, disponibilidade e compreensão em todos os momentos que precisei.

A minha **família de Pelotas**, todos os **amigos** que fiz e que levarei em meu coração, obrigada por terem cruzado meu caminho e por fazer minha vida muito melhor.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desta dissertação, meus agradecimentos mais sinceros.

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, que conta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

RESUMO

DANTAS, Raquel Venâncio Fernandes. **Caracterização físico-mecânica e biológica de cimentos experimentais à base de MTA para o complexo dentino-pulpar**. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas.

Há necessidade de desenvolvimento de novos cimentos odontológicos para otimizar as estratégias da terapia pulpar. Este estudo objetivou avaliar características físico-mecânica e biológica de cimentos experimentais (Híbrido, Pasta e Resinoso), comparando-os ao MTA (Angelus®, Londrina, PR, Brasil) e um cimento de ionômero de vidro, desenvolvido em nosso laboratório. Para os testes físico-mecânico e biológico, espécimes com dimensões padrão foram confeccionados. Para o pH, os espécimes foram imersos em meio de cultura (DMEM) enriquecido com SFB (soro fetal bovino) e analisados por pH-metro digital nos tempos: 3, 24, 48 e 72h. Para a resistência à tração diametral, espécimes cilíndricos foram submetidos a carga compressiva até a fratura. Na avaliação da citotoxicidade, células 3T3 foram cultivadas e expostas aos eludatos dos cimentos. A viabilidade celular foi determinada utilizando o teste MTT. Os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). O grupo Pasta apresentou valores de pH semelhantes ao MTA, assim como o grupo Híbrido seguiu os parâmetros do CIV ($p > 0,05$). Todos os materiais apresentaram valores de pH alcalinos ou próximos a neutralidade nos tempos avaliados. O MTA e o CIV apresentaram resultados de resistência similares. Os menores e maiores valores observados foram do grupo Pasta e Resinoso, respectivamente ($p < 0,05$). A viabilidade celular para os grupos MTA, Híbrido, Pasta, Resinoso, quando comparados ao grupo controle foi de: 49, 93, 90 e 86%, respectivamente. Considerando este estudo *in vitro*, nós concluímos que o cimento experimental Resinoso, que é fotoativado, apresentou desempenho similar ou superior aos materiais controles testados.

Palavras-chave: polpa dentária; cimentos odontológicos; biocompatibilidade; propriedades mecânicas.

ABSTRACT

DANTAS, Raquel Venâncio Fernandes. **Caracterização físico-mecânica e biológica de cimentos experimentais à base de MTA para o complexo dentino-pulpar.** 2011. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas.

There is a need to develop new cements to optimize pulp therapy strategies. The aim of this study was evaluate physic-chemical and biological parameters of experimental cements (Hybrid, Paste and Resinous), including pH, diametral tensile strength and cytotoxicity of these experimental cements comparing them to MTA (Angelus®, Londrina, PR, Brazil) and a glass ionomer cement developed in our laboratory. For the physic-mechanical and biological tests specimens with standard dimensions were produced. For pH measurement, specimens were immersed in culture medium (DMEM) supplemented with FBS (fetal bovine serum) and analyzed by digital pH meter at 3, 24, 48 and 72h. For diametral tensile strength test the specimens were subjected to compressive load until the fracture. To evaluate cytotoxicity 3T3 cells were cultured and exposed to the cement eluates. The cell viability was detected using MTT test. The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$). The Paste group showed pH values similar to the MTA, as well as the Hybrid group was similar to the GIC group ($p > 0.05$). All materials presented alkaline pH values or were near to neutrality on evaluated times. MTA and GIC showed similar strength results. The lowest and highest strength values were observed in groups Paste and Resinous, respectively ($p < 0.05$). Cell viability for MTA, Hybrid, Paste and Resinous groups, were 49, 93, 90 and 86% respectively, when compared to the control group. Considering this in vitro study, we concluded that the photo-cured Resinous experimental cement presented a performance similar or superior to the commercial or other experimental materials tested.

Keywords: dental pulp; dental cements; biocompatibility; mechanical properties.

Lista de figuras

Projeto de pesquisa

Figura 1. Cultura de fibroblastos 3T3 com meio, acrescido de soro fetal bovino e antibiótico.....	21
Figura 2. Confeção dos corpos-de-prova; a) Proporcionamento; b) Manipulação; c) Inserção do cimento na matriz; d) Carga posicionada sobre os corpos-de-prova.....	22
Figura 3. Obtenção do eludato dos materiais.....	23
Figura 4. Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader-BIO-TEK Instruments, ICC).....	23
Figura 5. Esquema ilustrativo de uma placa de 96 poços e a disposição dos grupos para avaliação de citotoxicidade.....	24
Figura 6. pHmetro digital (Analion PM 608 Plus, Ribeirão Preto, SP, Brasil).....	26
Figura 7. Paquímetro digital (Mitutoyo 500-144B, Suzano -SP, Brasil).....	28
Figura 8. Máquina de ensaio universal (EMIC 2000, Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA., São José dos Pinhais, PR, Brasil).....	29

Artigo científico

Figura 1.....	62
---------------	----

Lista de tabelas

Projeto de pesquisa

Tabela 1. Composição dos materiais utilizados.....	20
--	----

Artigo científico

Tabela 1.....	59
Tabela 2.....	60
Tabela 3.....	61

SUMÁRIO

1. Projeto de pesquisa	
1.1 Introdução.....	12
1.2 Justificativa.....	17
1.3 Objetivos.....	18
1.4 Material e métodos.....	19
1.4.1 Material.....	19
1.4.2 Métodos.....	20
1.4.2.1 Cultivo Celular.....	20
1.4.2.2 Teste de Citotoxicidade.....	21
1.4.2.3 Teste de Genotoxicidade (Contagem de Micronúcleos).....	24
1.4.2.4 Análise de pH.....	25
1.4.2.5 Avaliação da sorção e solubilidade.....	26
1.4.2.6 Resistência à tração diametral.....	28
1.4.2.7 Tratamento estatístico.....	29
Referências.....	31
Orçamento.....	36
Cronograma de execução.....	38
Recursos financeiros disponíveis.....	39
Aspectos tecnológicos.....	40
2. Relatório de trabalho de campo.....	41
3. Artigo científico.....	42
4. Conclusões.....	61
Referências.....	62

1 PROJETO DE PESQUISA

1.1 Antecedentes

A polpa dentária é um tecido conjuntivo especializado que, como a maioria dos tecidos humanos, apresenta uma capacidade de regeneração limitada. (DEMARCO, *et al.*, 2011). É caracterizada pela presença de odontoblastos e por estar enclausurada por tecido mineralizado (NÖR, 2006). Além disso, é infiltrada por inúmeros vasos sanguíneos e nervosos (NAKASHIMA E AKAMINE, 2005). Tem por função primordial a formação de dentina, que começa no momento em que as células mesenquimais periféricas se diferenciam em odontoblastos e iniciam o processo de deposição da matriz colágena e mineralização para formação do órgão dentário. Enquanto a polpa é biologicamente ativa, este processo é um evento fisiológico e contínuo. Outra atividade da polpa é o transporte de nutrientes e fluidos, mantendo a vitalidade pulpar e a resiliência necessária para neutralizar as tensões mastigatórias impostas à dentina. Ademais, a polpa é responsável por respostas a diferentes estímulos. (PASHLEY, 1996)

A dentina possui uma estrutura tubular que a mantém em íntima relação com a polpa, devido à presença dos processos odontoblásticos em seu interior (LINDE E GOLDBERG, 1993). Assim, qualquer estímulo imposto a este tecido irá desencadear resposta dos odontoblastos e das demais células pulpares (SMITH, 2003). Lesões de natureza mecânica, química e microbiana de baixa intensidade, desencadeiam uma série de eventos moleculares, os quais sinalizam para os odontoblastos intensificarem sua atividade secretória e assim produzir dentina reacional, bem como esclerose dentinária, no local subjacente a injúria (GOLDBERG E SMITH, 2004). Foi demonstrado que a polpa de dentes decíduos (MIURA, *et al.*, 2003) e permanentes (GRONTHOS, *et al.*, 2000) possui em seu interior uma população de células progenitoras multipotentes, as quais, provavelmente, são responsáveis pelo

processo de reparo do Complexo Dentino-Pulpar (CDP) (GRAHAM, *et al.*, 2006; TOMSON, *et al.*, 2007).

Quando o CDP é submetido a injúrias de grande intensidade e rápida progressão, como lesões de cárie aguda, que proporcionam a destruição dos odontoblastos (BJØRNDAL E MJÖR, 2001) há uma sinalização para que as células progenitoras, presente no tecido pulpar, migrem para o sítio da injúria (ARANA-CHAVEZ E MASSA, 2004). Após o processo de migração, essas células se diferenciam em células odontoblastóides e iniciam a secreção de dentina reparadora (NAKASHIMA E AKAMINE, 2005; TÉCLÈS, *et al.*, 2005; TÉCLÈS, *et al.*, 2008).

A proteção do complexo dentino-pulpar consiste na aplicação de uma ou mais camadas de materiais estimuladores de reparo entre o material restaurador e o tecido dentário buscando minimizar mudanças adicionais ao tecido pulpar, causados pelos procedimentos restauradores, agentes bacterianos, devido à microinfiltrações e à toxicidade dos materiais empregados. (BRISO, *et al.*, 2006).

O capeamento pulpar é um tipo de tratamento que pode ser realizado de forma direta, para pequenas exposições mecânicas ou traumáticas, quando há uma condição de resposta favorável (KOPEL, 1997; AGAMY, *et al.*, 2004; MAROTO, *et al.*, 2005; CAICEDO, *et al.*, 2006; TUNA E OLMEZ, 2008). Já o capeamento pulpar indireto é realizado em dentes com diagnóstico de pulpíte reversível e cárie profunda, havendo a interposição de dentina remanescente entre o material protetor e órgão pulpar (CAMP, FUKS, 2006).

O hidróxido de cálcio, em suas diversas formas de apresentação, tem sido largamente utilizado por apresentar propriedades de estímulo, reparação e formação de dentina para proteção da polpa contra agentes antibacterianos e estímulos térmicos (FOREMAN E BARNES, 1990; STANLEY E PAMEIJER, 1997). Indicado em várias situações clínicas, devido seu potencial biológico e terapêutico, sendo ainda considerado o material de escolha nos procedimentos conservadores da polpa, constituindo-se, também, no padrão-ouro dos testes de biocompatibilidade pelo seu efeito na exposição pulpar. (DEMARCO, *et al.*, 2001).

A reparação pulpar utilizando hidróxido de cálcio não é bem esclarecida na literatura, porém tem sido reportado que o elevado pH alcalino age solubilizando algumas proteínas e fatores de crescimento, os quais estimulam os odontoblastos na produção de dentina (GRAHAM, *et al.*, 2006).

Apesar de resultados promissores observados quando da utilização do hidróxido de cálcio, alguns questionamentos tem sido relacionados ao seu emprego, pois o mesmo apresenta alta solubilidade, podendo desaparecer sob restaurações na presença de infiltração, o seu efeito é de curta duração sendo rapidamente tamponado pelo fluido canalicular, não é o único material que estimula o reparo, tem baixa resistência mecânica e não tem adesividade às estruturas dentárias e aos materiais restauradores (DEMARCO, *et al.*, 2001). Ademais, estudos clínicos a longo prazo tem demonstrado um baixo índice de sucesso dos tratamentos pulpares diretos/pulpotomias, especialmente quando a exposição é decorrente de processo carioso (BARTHEL, *et al.*, 2000; DEMARCO, *et al.*, 2005). Tais resultados podem estar relacionados à dificuldade do diagnóstico das pulpites por parte dos profissionais.

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) é um material relativamente novo (MIYASHITA, *et al.*, 2007) que foi desenvolvido para interagir com os tecidos periapicais. No entanto, os estudos mais recentes mostram seu sucesso como agente capeador pulpar (LEITES, *et al.*, 2011). Sendo assim, vários trabalhos têm comparado o MTA e o hidróxido de cálcio por serem materiais utilizados em procedimentos para terapêutica pulpar. Seus benefícios sobre o hidróxido de cálcio incluem diminuição da inflamação, menor hiperemia e necrose dos tecidos pulpares, além disto, reforça a formação da ponte de dentina. (FORD, *et al.*, 1996; FARACO E HOLLAND, 2001; TZIAFAS, *et al.*, 2002; AEINEHCHI, *et al.*, 2003; DOMINGUEZ, *et al.*, 2003; LEITES, *et al.*, 2011).

Estes dados demonstram que o MTA possui propriedades biológicas superiores ao hidróxido de cálcio e quando utilizado durante o capeamento pulpar, há uma série de eventos celulares que culminam no reparo e formação de ponte dentinária. Também tem sido demonstrado que o MTA teria um maior potencial de solubilização da dentina e liberação de fatores de crescimento, quando comparado ao Ca(OH)_2 , o que poderia favorecer a resposta biológica (TOMSON, *et al.*, 2007).

Apesar dos dados estimulantes em relação ao MTA (WITHERSPOON, 2008), o mesmo apresenta algumas limitações como: alta solubilidade, demonstrando 24% de perda em 78 dias após armazenagem em água (FRIDLAND E ROSADO, 2003; 2005); presença do ferro no MTA cinza que pode levar ao escurecimento dos dentes tratados (AEINEHCHI, *et al.*, 2003); prolongado tempo de presa de 2 horas e 45 minutos (TORABINEJAD, *et al.*, 1995; ISLAM, *et al.*, 2006). O

elevado tempo de presa exige que o capeamento pulpar utilizando o MTA seja realizado em duas etapas clínicas, sendo colocado um material temporário sobre o MTA, ou usando um forrador de presa rápida antes do material restaurador definitivo. Outra limitação deste material é a dificuldade de aplicação, quando comparado ao hidróxido de cálcio. Estas propriedades dificultam seu emprego como capeador pulpar, além de apresentar custo relativamente alto (HILTON, 2009), especialmente quando se considera a possibilidade de aplicação em serviço público. Ainda, o MTA, de maneira análoga ao hidróxido de cálcio, pode ser considerado um tratamento pulpar vital não biológico (RUTHERFORD E FITZGERALD, 1995), pois o reparo pulpar acontece às expensas do tecido pulpar sadio remanescente.

Dentre os materiais indicados como capeador pulpar indiretos estão os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) que foram desenvolvidos por Wilson e Kent (1971), e introduzidos no mercado nos anos 70. Sua popularidade é devido ao fato desses materiais apresentarem propriedades importantes como liberação de flúor, coeficiente de expansão térmica e módulo de elasticidade similar à dentina, adesão ao esmalte e dentina e biocompatibilidade (WILSON; KENT, 1971). Apesar dessas vantagens, os CIVs convencionais apresentam limitações como material restaurador, tais como propriedades físicas reduzidas, alta solubilidade e longo tempo de presa (MOUNT, 1994).

Recentemente, foi introduzida uma nova versão dos CIVs com ativação pela luz. Nesta segunda geração, os monômeros hidrofílicos e iniciadores de polimerização foram adicionados aos componentes dos CIVs convencionais, constituindo os CIVs modificados por resina (PALMER, *et al.*, 1999).

A incorporação de componentes, como o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), resultam em maior resistência à flexão, resistência à tração diametral, módulo de elasticidade e resistência ao desgaste (XIE, *et al.*, 2000), no entanto, aumenta os efeitos citotóxicos, tornando-os menos biocompatíveis quando comparados aos CIVs convencionais (STANISLAWSKI, *et al.*, 1999; ARANHA, *et al.*, 2006), podendo se difundir pela dentina e causar irritação à polpa (NICHOLSON E CZARNECKA, 2008).

Mais recentemente, uma versão pasta-líquido de CIVs modificados por resina tem sido desenvolvido e introduzido no mercado em dispositivos que facilitam a manipulação, oferecendo melhoria na mistura dos componentes e diminuindo o tempo clínico. Um estudo recente mostrou que uma formulação com estas

características causou danos iniciais leves na polpa diminuindo com o tempo, indicando biocompatibilidade aceitável, similar aos CIVs convencionais, quando aplicado em cavidades profundas (COSTA, *et al.*, 2011).

De acordo com Rutherford e Fitzgerald (1995), idealmente o material a ser colocado sobre o órgão pulpar deveria apresentar mecanismo de reparo sem dano ao tecido pulpar remanescente, devendo a neoformação de tecido dentinário ocorrer em substituição ao agente capeador. Deste modo, haveria a necessidade de desenvolvimento de novos materiais que pudessem sanar limitações dos materiais disponíveis atualmente, proporcionando otimização das estratégias conservadoras pulpares (DEMARCO, *et al.*, 2010).

Diante do exposto, este trabalho objetiva o desenvolvimento de novos materiais capeadores pulpares, que apresentem vantagens em relação aos atualmente disponíveis no mercado.

1.2 Justificativa

O desenvolvimento de materiais alternativos à terapia pulpar é de grande importância devido à dificuldade no acesso a serviços odontológicos especializados, como a endodontia. Sendo assim, a restrição dos materiais empregados para este fim, somado ao custo elevado destes, são fatores relevantes ao tratamento.

O conhecimento da compatibilidade biológica dos materiais capeadores, aliado às propriedades físico-mecânicas, é um parâmetro importante para evitar ou diminuir a irritação pulpar ou degeneração. Portanto, o desenvolvimento de novas formulações de agentes capeadores possibilitará aumento nas perspectivas do sucesso do tratamento da polpa.

Além disso, o desenvolvimento de novos produtos com capacidade de chegarem ao mercado odontológico representa possibilidade de geração de desenvolvimento regional, através de produtos com maior valor agregado, com estímulo à indústria nacional, realizando a substituição de produtos importados, e corroborando para a redução de evasão de recursos para outros países.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

- Caracterizar físico-mecânica e biologicamente cimentos experimentais utilizados para capeamento pulpar.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de cimentos experimentais utilizados para capeamento pulpar;
- Avaliar a genotoxicidade de cimentos experimentais utilizados para capeamento pulpar;
- Avaliar características físico-químicas e mecânicas de cimentos experimentais utilizados para capeamento pulpar.

1.4 Material e métodos

1.4.1 Material

Os componentes dos cimentos a serem desenvolvidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Composição dos materiais utilizados no estudo.

Materiais	Composição	Tipo de presa	Proporção
Híbrido	Pó: composição do pó do CIV + MTA; Líquido: H ₂ O destilada + líquido do CIV	Química	1:1
Resinoso	Pó: MTA, Fluoreto de Itérbio, DHEPT, EDAB; Líquido: PEGUDMA 400, TEGDMA, H ₂ O, GDMAP, UDMA, canforoquinona, peróxido de benzoíla	Fotopolimerizado	3:2
Pasta	Pasta 1: MTA, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, canforoquinona, DHEPT, EDAB; Pasta 2: Fluoreto de Ytérbio, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, peróxido de benzoíla	Fotopolimerizado	1:1
Agregado de Trióxido Mineral (MTA, Angelus®)	Pó: Bi ₂ O ₃ , CaO, MgO, K ₂ O, Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , SO ₃ , SiO ₂ , Al ₂ O ₃ ; Líquido: água destilada	Química	3:1
Cimento de Ionômero de Vidro (CIV)	Pó: cristais de fluoraluminiosilicato radiopaco, ácido policarboxílico e pigmentos; Líquido: copolímeros de ácidos policarboxílico, maleico, itacônico, tartárico e água purificada	Química	1:1

CIV- cimento de ionômero de vidro; MTA- agregado de trióxido mineral; PEGUDMA 400- polietilenoglicol dimetacrilato 400; TEGDMA- trietilenoglicol dimetacrilato; GDMA-P- Glicol dimetacrilato fosforado; UDMA- uretano dimetacrilato; DHEPT- N,N-dihidroxietil-p-toluidina; EDAB- etil 4-dimetilamino benzoato; Bis-EMA- polietilenoglicol dieter dimetacrilato; Bi₂O- dióxido de bismuto; CaO- óxido de cálcio; SiO₂- óxido de silício; Al₂O₃- óxido de alumínio.

1.4.2 Métodos

1.4.2.1 Cultivo Celular

Uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH será utilizada neste estudo. Para tanto, utilizaremos um meio de cultura completo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-SIGMA Chemical Co., St Louis - MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB-Cultilab, Campinas - SP, BR), 2% de L-glutamina, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100U/mL) (Fig. 1). Em cada poço teste de uma placa de 96 poços serão colocadas 2×10^4 células em 200µL de DMEM acrescido de SFB. A placa será incubada em estufa de CO₂ com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂ por 24h de forma a permitir a adesão das células no fundo da placa de cultivo.

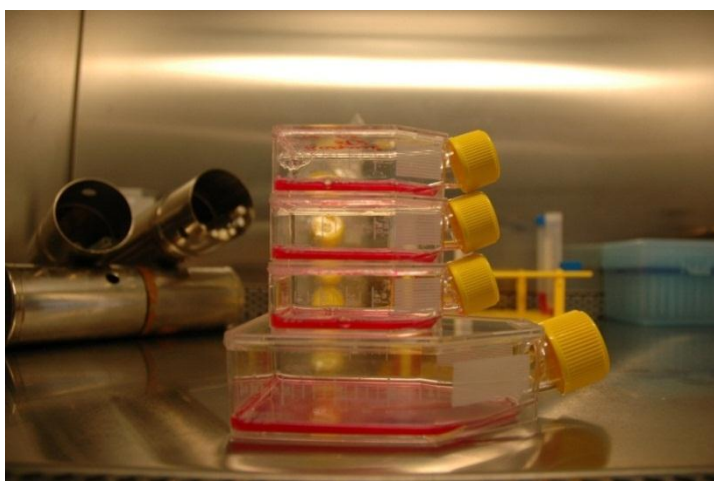


Figura 1- Cultura de fibroblastos 3T3 com meio, acrescido de soro fetal bovino e antibiótico.

1.4.2.2 Teste de Citotoxicidade

Para este teste, serão confeccionados corpos-de-prova dos materiais estudados (Fig. 2) os quais serão imersos em 1mL de meio de cultura DMEM e incubados em estufa (Fig. 3) (37°C, 5% de CO₂) por 24h. Após, o eludato dos produtos será adicionado aos poços testes e a placa incubada (37°C, 5% de CO₂) por 24h, para permitir que os produtos atuem na monocamada celular.

A viabilidade celular será avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), que se baseia na capacidade das

células viáveis reduzirem metabolicamente o MTT por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica num cristal de formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular.

Passadas 24h, o meio com os produtos testes de cada poço será sugado e darão lugar à 20µL, por poço, de solução de MTT (2mg/mL de DMEM). Em seguida serão novamente incubados por 4h de forma a permitir o metabolismo do MTT. Após o período, o meio será sugado e o formazan ressuspendido e 200µL de dimetil sulfóxido (DMSO).



Figura 2- Confeção dos corpos-de-prova; a) Proporcionamento; b) Manipulação; c) Inserção do cimento na matriz; d) Carga posicionada sobre os corpos-de-prova.



Figura 3- Obtenção do eludato dos materiais.

Os resultados serão avaliados por meio de espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIO-TEK Instruments, ICC), em comprimento de onda de 570nm, onde serão considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular (Fig. 4). Este teste será realizado segundo o trabalho de Fernandez, *et al.*, 2010.



Figura 4- Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIO-TEK Instruments, ICC).

Os meios incubados com cada material irão preencher oito poços da placa de cultivo (200µl cada). Além das referências comerciais, serão utilizados um controle

positivo (poços com células e sem material) e um controle negativo (poços sem células, somente com DMEM) ficando dispostos da seguinte maneira:

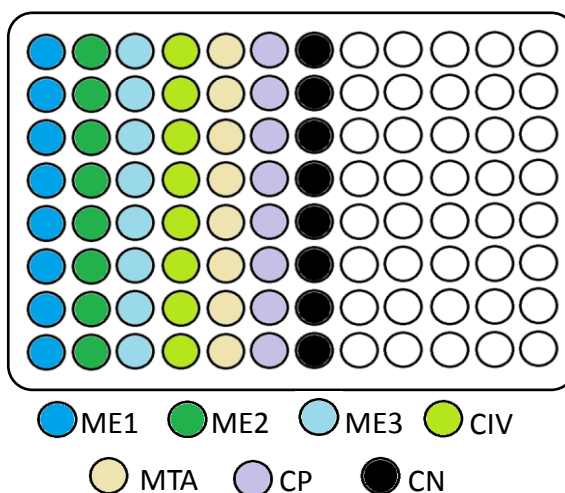


Figura 5- Esquema ilustrativo de uma placa de 96 poços e a disposição dos grupos para avaliação de citotoxicidade.

1.4.2.3 Teste de Genotoxicidade (Contagem de Micronúcleos)

Os fibroblastos que serão utilizados no teste de genotoxicidade crescerão em subconfluência em garrafas de cultivo de 25cm² nas condições descritas anteriormente. As células serão cultivadas por cinco dias antes de serem expostas aos eludatos, com o objetivo de atingir um crescimento exponencial.

Logo após, as células serão separadas da garrafa de cultivo com auxílio de tripsina, em contato com as células por 5 minutos e então, 3×10^4 células serão semeadas em cada poço da placa de 96 poços, junto a 5mL de meio de cultura acrescido de SFB. Então, lamínulas circulares de 13mm de diâmetro, com auxílio de uma pinça estéril, serão colocadas em cada poço, sendo a placa incubada em estufa (37°C, 5%CO₂) por 24h. Logo, será removido o meio de cultura e 400µL dos eludatos serão acrescentados em cada poço.

Passadas 24h, as células de cada grupo serão fixadas em lâminas com solução de metanol e ácido acético (3:1) e posteriormente, serão coradas pela

Técnica Feulgen, que consiste na lise das células, por meio da oxidação em solução de ácido clorídrico (1N) e coloração com reagente de Schiff e corante Fast Green.

Para a técnica de Feulgen, cada lâmina será imersa três vezes em solução de ácido clorídrico (1N) e seguidamente lavadas em água destilada por duas vezes.

Depois de secas, as lâminas serão coradas pelo reagente de Schiff, ficando imersas por 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Seguidamente, o reagente será removido das lâminas e estas cobertas por água tamponada por 1 minuto. Mais uma vez, as lâminas serão lavadas em água destilada para serem secas por um período de 24h. No dia seguinte, cada lâmina será imersa no corante Fast Green por 10 segundos, e depois lavadas em álcool metílico 96°GL, por 3 segundos cada imersão onde serão secas por 24 horas, e posteriormente fixadas em lâminas histológicas previamente identificadas.

Os micronúcleos serão visualizados em microscópio óptico comum (Olympus CX2, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), com objetiva de 40x e oculares de 10x. Antes de iniciar a contagem de micronúcleos, cada lâmina será codificada para propiciar a avaliação imparcial do observador. A determinação da proporção de micronúcleos será mediante a contagem manual de células micronucleadas, em 1000 células por lâmina.

Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos serão os mesmos descritos por (COUNTRYMAN E HEDDLE, 1976), a saber: os micronúcleos devem apresentar um contorno regular, redondo ou oval, e estar dentro do citoplasma da célula; estar no mesmo plano focal e apresentar uma cor semelhante ao núcleo principal; ter um diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal e se encontrar marginal ou justaposto ao mesmo.

1.4.2.4 Análise de pH

Serão confeccionados 15 espécimes de cada material (1,0mm de espessura e 4,0mm de diâmetro interno) conforme mostrado na Figura 2, sendo cada amostra armazenada em um frasco contendo 1mL de meio DMEM (Fig. 3). Após, os espécimes serão incubados em estufa a 37°C e os valores de pH aferidos nos seguintes intervalos de tempo: 3, 24, 48, 72h, 7 dias e 14 dias com auxílio de um

pHmetro digital (Analion PM 608 Plus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Fig. 6). Durante as análises, o pH de cada amostra será registrado em um frasco plástico com substituição do líquido (TANOMARU-FILHO, *et al.*, 2009).



Figura 6- pHmetro digital (Analion PM 608 Plus, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

1.4.2.5 Avaliação da sorção e solubilidade

Para cada material serão confeccionados 10 corpos de prova empregando uma matriz metálica com dimensões internas de 6mm de diâmetro e 1mm de profundidade. A matriz será posicionada sobre uma placa de vidro previamente isolada por uma lâmina de poliéster. Cada blenda será inserida no interior da matriz uniformemente, em única camada e posteriormente coberta por outra lamina de poliéster. Uma segunda placa de vidro será posicionada sobre o conjunto e levemente pressionada para a remoção dos excessos.

Para os materiais fotopolimerizados, a placa de vidro superior será então removida e o corpo de prova fotoativado por 40 segundos em cada face utilizando um LED (Radil[®] Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) com intensidade de 1400mW/cm².

Os corpos-de-prova serão então removidos da matriz e o acabamento da periferia realizado com lixas de carbeto de silício de granulação fina (#1200, Norton Abrasivos Brasil, São Paulo - SP, Brasil).

Após o acabamento, os corpos-de-prova serão transferidos para um dissecador mantido a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ contendo cloreto de cálcio e sílica gel. Depois de 2 semanas de armazenamento, eles serão removidos e pesados em uma balança analítica (AUW 220D, Shimadzu Corp. Nakagyo-ku, Kyoto, Japão) com acurácia de 0,01mg. O ciclo será repetido diariamente até uma massa constante, m_1 , ser obtida, não havendo a perda maior que 0,1mg em cada período de 24 horas.

Após a secagem final, serão feitas duas mensurações do diâmetro em ângulos retos determinando o diâmetro médio de cada corpo de prova. Em seguida, a espessura média será determinada através da aferição da espessura no centro e em 4 pontos marginais espaçados igualmente na amostra. Então o volume (V) dos corpos-de-prova será calculado em mm^3 , empregando os valores aferidos do diâmetro médio e espessura média.

Os espécimes serão imersos em água destilada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias e então, removidos, lavados com água, e secos até a superfície ficar livre de umidade visivelmente detectável. Assim, a massa m_2 será aferida. Após essa pesagem, os espécimes serão recondicionados no dessecador e pesados diariamente até uma massa constante ser obtida e registrada como m_3 .

Os valores de sorção de água (W_{sp}) serão calculados em microgramas por milímetro cúbico usando a seguinte equação:

$$W_{sp} = \frac{m_2 - m_3}{V}$$

onde m_2 é a massa em microgramas após imersão em água por 7 dias, m_3 é a massa seca final, e V é o volume do corpo de prova. Já os valores de solubilidade (W_{sl}) serão calculados em microgramas por milímetro cúbico usando a seguinte equação:

$$W_{sl} = \frac{m1 - m3}{V}$$

onde ***m1*** é a massa seca inicial, antes da imersão em água, ***m3*** é a massa seca final, e ***V*** é o volume do corpo de prova.

1.4.2.6 Resistência à tração diametral

Para a realização deste ensaio mecânico, serão confeccionados 10 espécimes para cada material a ser avaliado (4,0 ± 0,1mm de diâmetro x 2,0 ± 0,1mm de espessura). Após, será removido o excesso usando lixas de granulação nº 600. Em seguida, as medidas serão aferidas utilizando-se um paquímetro digital (Mitutoyo 500-144B, Suzano-SP, Brasil) (Fig. 7). Os espécimes serão armazenados em água destilada a 37°C por 24h.

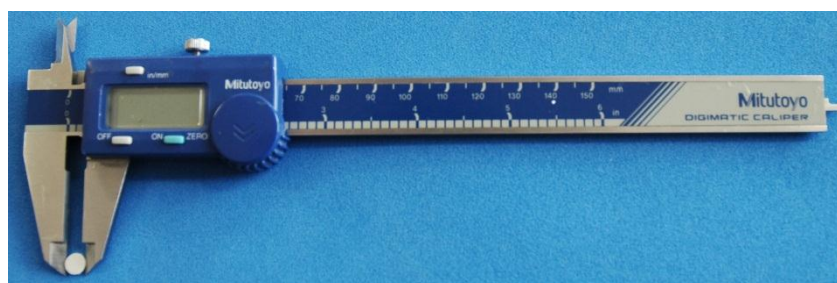


Figura 7- Paquímetro digital (Mitutoyo 500-144B, Suzano -SP, Brasil).

O teste será realizado em uma máquina de ensaio universal (EMIC 2000, Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA., São José dos Pinhais, PR, Brasil) (Fig. 8).



Figura 8- Máquina de ensaio universal (EMIC 2000, Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA., São José dos Pinhais, PR, Brasil).

A carga será aplicada verticalmente na parte lateral do cilindro a uma velocidade de 1,0mm/min, produzindo tensões de tração perpendicular ao plano vertical, passando pelo centro da amostra (ANUSAVICE, 2003).

Após cada ensaio de compressão, a carga de ruptura (F) expressa em newtons (N), foi gravada e a resistência à tração diametral (σ_t) (em MPa) foi calculada da seguinte maneira:

$$\sigma_t = 2F/\pi dh$$

onde: **d**= diâmetro (4mm); **h**: espessura do espécime (6mm); π = 3,1416

1.4.2.7 Tratamento estatístico

Após a coleta dos dados, os mesmos serão tabulados em um banco de dados a ser criado no programa estatístico SigmaStat® (Versão 3.5 *for Windows*®, Systat Software Incorporation, San Jose-CA, EUA) e posteriormente analisados de maneira descritiva, por meio de gráficos e tabelas. Além disso, será feita análise estatística inferencial a partir da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Referências

ANUSAVICE, K. J. **Phillips: science of dental materials**. 11th ed. St. Louis: W B Saunders; 2003.

AEINEHCHI, M.; ESLAMI, B.; GHANBARIHA, M.; SAFFAR, A. S. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. **Intenational Endodontic Journal**, v. 36, n. 3, p. 225-31, Mar. 2003.

AGAMY, H. A.; BAKRY, N. S.,; MOUNIR, M. M.; AVERY, D. R. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatric Dentistry**, v. 26, n. 4, p. 302-9, Jul./Ago. 2004.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; MASSA, L. F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 8, p. 1367-73, Ago. 2004.

ARANHA, A. M. GIRO, E. M.; SOUZA, P. P.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. **Dental Materials**, v. 22, n. 9, p. 864-9, Set. 2006.

BARTHEL, C. R. ROSENKRANZ, B.; LEUENBERG, A.; ROULET, J. F.. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 9, p. 525-8, Set. 2000.

BJØRNDAL, L.; MJÖR, I. A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence International**, v. 32, n. 9, p. 717-36, Out. 2001.

BRISO, A. L. RAHAL, V.; MESTRENER, S. R.; DEZAN JUNIOR, E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. **Brazilian Oral Research**, v. 20, n. 3, p. 219-25, 2006 Jul./Set. 2006.

CAICEDO, R.; ABBOTT, P. V.; ALONGI, D. J.; ALARCON, M. Y. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. **Australian Dental Journal**, v. 51, n. 4, p. 297-305, Dez. 2006.

CAMP, J. H.; FUKS, A. B. **Pediatric endodontics: endodontic treatment for the primary and young permanent dentition.** In: Cohen S, Hargreaves KM, eds. *Pathway of the Pulp*, 9th ed. St Louis, MO, USA: Mosby, pp. 822–81, 2006.

COSTA, C. A.; RIBEIRO, A. P.; GIRO, E. M.; RANDALL, R. C.; HEBLING, J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. **Dental Materials**, v. 27, n. 7, p. e158-70, Jul. 2011.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 41, n. 2-3, p. 321-32, Dez. 1976.

DEMARCO, F. F.; CASAGRANDE, L.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; TARQUINIO, S. B.; ZEITLIN, B. D.; SHI, S.; SMITH, A. J.; NÖR, J. E. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1805-11, Nov. 2010.

DEMARCO, F. F.; CONDE, M. C. M.; CAVALCANTI, B. N.; CASAGRANDE, L.; SAKAI, V. T.; NÖR, J. E. Dental pulp tissue engineering. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 1, p. 3-13, Ago. 2011.

DEMARCO, F. F.; ROSA, M. S.; TARQUINIO, S. B.; PIVA, E. Influence of the restoration quality on the success of pulpotomy treatment: a preliminary retrospective study. **Journal Applied Oral Science**, v. 13, n. 1, p. 72-7, Mar. 2005.

DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B.; JAEGER, M. M.; DE ARAÚJO, V. C.; MATSON, E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quintessence International**, v. 32, n. 3, p. 211-20, Mar. 2001.

DOMINGUEZ, M. S.; WITHERSPOON, D. E.; GUTMANN, J. L.; OPPERMAN, L. A. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 5, p. 324-33, Mai. 2003.

FARACO, I. M.; HOLLAND, R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. **Dental Traumatology**, v. 17, n. 4, p. 163-6, Ago. 2001.

FERNANDEZ, M. R.; CARVALHO, R. V.; OGLIARI, F. A.; BEIRA, F. A.; ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 2, p. 102-08, Fev. 2010.

FORD, T. R.; TORABINEJAD, M.; ABEDI, H. R.; BAKLAND, L. K.; KARIYAWASA, S. P. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **The Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 10, p. 1491-4, Out. 1996.

FOREMAN, P. C.; BARNES, I. E. Review of calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 23, n. 6, p. 283-97, Nov. 1990.

FRIDLAND, M.; ROSADO, R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 12, p. 814-7, Dez. 2003.

FRIDLAND, M.; ROSADO, R.; ENG, C. MTA solubility: a long term study. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 5, p. 376-9, Mai. 2005.

GOLDBERG, M.; SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. **Critical Reviews Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 1, p. 13-27, Jan. 2004.

GRAHAM, L.; COOPER, P. R.; CASSIDY, N.; NOR, J. E.; SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2865-73, Mai. 2006.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; GEHRON ROBEY, P.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dez. 2000.

HILTON, T. J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-25, 2009 Set./Out. 2009.

ISLAM, I.; CHNG, H. K.; YAP, A. U. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 3, p. 193-7, Mar. 2006.

KOPEL, H. M. The pulp capping procedure in primary teeth "revisited". **American Society of Dentistry for Children**, v. 64, n. 5, p. 327-33, 1997 Set./Out. 1997.

LEITES, A.; BALDISSERA, E.; SILVA, A.; TARQUINIO, S.; BOTERO, T.; PIVA, E.; DEMARCO, F. Histologic Response and Tenascin and Fibronectin Expression After Pulp Capping in Pig Primary Teeth With Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide. **Operative Dentistry**, Ago. 2011.

LINDE, A.; GOLDBERG, M. Dentinogenesis. **Critical Reviews Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 5, p. 679-728, 1993.

MAROTO, M.; BARBERÍA, E.; PLANELLS, P.; GARCÍA GODOY, F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **American Journal of Dentistry**, v. 18, n. 3, p. 151-4, Jun. 2005.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, Mai. 2003.

MIYASHITA, H.; WORTHINGTON, H. V.; QUALTROUGH1, A.; PLASSCHAERT, A. Pulp management for caries in adults: maintaining pulp vitality. **Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 2, p. Fev. 2007.

MOUNT, G. J. Buonocore Memorial Lecture. Glass-ionomer cements: past, present and future. **Operative Dentistry**, v. 19, n. 3, p. 82-90, 1994 Mai./Jun. 1994.

NAKASHIMA, M.; AKAMINE, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 10, p. 711-8, Out. 2005.

NICHOLSON, J. W.; CZARNECKA, B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. **Dental Materials**, v. 24, n. 12, p. 1702-8, Dez. 2008.

NÖR, J. E. Tooth regeneration in operative dentistry. **Operative Dentistry**, v. 31, n. 6, p. 633-42, Nov./Dez. 2006.

PALMER, G.; ANSTICE, H. M.; PEARSON, G. J. The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 303-11, Mai. 1999.

PASHLEY, D. H. Dynamics of the pulpo-dentin complex. **Critical Reviews Oral Biology & Medicine**, v. 7, n. 2, p. 104-33, 1996.

RUTHERFORD, B.; FITZGERALD, M. A new biological approach to vital pulp therapy. **Critical Reviews Oral Biology & Medicine**, v. 6, n. 3, p. 218-29, 1995.

SMITH, A. J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **Journal of Dental Education**, v. 67, n. 6, p. 678-89, Jun. 2003.

STANISLAWSKI, L.; DANIAU, X.; LAUTI, A.; GOLDBERG, M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. 3, p. 277-88, Mai. 1999.

STANLEY, H. R.; PAMEIJER, C. H. Dentistry's friend: calcium hydroxide. **Operative Dentistry**, v. 22, n. 1, p. 1-3, 1997 Jan./Fev. 1997.

TANOMARU-FILHO, M.; Chaves Faleiros, F. B.; Saçaki, J. N.; Hungaro Duarte, M. A.; Guerreiro-Tanomaru, J. M. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 10, p. 1418-21, Out. 2009.

TOMSON, P. L.; GROVER, L. M.; LUMLEY, P. J.; SLOAN, A. J.; SMITH, A. J.; COOPER, P. R. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. **Journal of Dental Research**, v. 35, n. 8, p. 636-42, Ago. 2007.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; MCDONALD, F.; PITT-FORD, T. R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 7, p. 349-53, Jul. 1995.

TUNA, D.; OLMEZ, A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 4, p. 273-8, Abr. 2008.

TZIAFAS, D.; PANTELIDOU, O.; ALVANOU, A.; BELIBASAKIS, G.; PAPADIMITRIOU, S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 245-54, Mar. 2002.

TÉCLÈS, O.; LAURENT, P.; AUBUT, V.; ABOUT, I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 1, p. 180-7, Abr. 2008.

TÉCLÈS, O.; LAURENT, P.; ZYGOURITSAS, S.; BURGER, A. S.; CAMPS, J.; DEJOU, J.; ABOUT, I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 2, p. 103-8, Fev. 2005.

WITHERSPOON, D. E. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 7 Suppl, p. S25-8, Jul. 2008.

XIE, D., BRANTLEY, W. A.; CULBERTSON, B. M.; WANG, G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v. 16, n. 2, p. 129-38, Mar. 2000.

Orçamento

Descrição	Quantidade	Custo (unidade, em R\$)	Custo (total, em R\$)
Canforoquinona	10g	410,00	410,00
EDAB	10g	300,00	300,00
PEG 400 UDMA	500 g	350,00	350,00
TEGDMA	500 g	350,00	350,00
Bis-GMA	500 g	350,00	350,00
CIV	5 unidades	54,00	270,00
MTA	250g	324,60	81.150,00
PBS pH 7,2 10xconcentrado 500ml, Gibco®	3 frascos	226,80	680,40
Solução de penicilina / estreptomicina 100ml, Gibco®	1 frasco	159,30	159,30
Soro fetal bovino 500ml, Invitrogen®	5 frascos	310,50	1.552,50
Solução tripsina c/ EDTA 0,25% 500ml, Gibco®	5 frascos	306,50	1.532,50
MTT - Azul de tiazol 1g, Sigma®	1 frasco	498,00	498,00
Ponteira azul 100-1000µL c/ 1000, Axygen® (Livre de DNase, RNase, Pirogênios, Minerais ou Metais Pesados)	5 pacotes	34,80	174,00
Ponteira amarela 1-200µL c/ 1000, Axygen® (Livre de DNase, RNase, Pirogênios, Minerais ou Metais Pesados)	5 pacotes	32,30	161,50
Placa p/ cultura tecidos c/ tampa	100	5,50	550,00

fundo chato 96 poços, TPP® (Livre de DNase, RNase, Pirogênios, Minerais ou Metais Pesados)	unidades		
Frasco (garrafa) cultura celular 25cm² c/ 10, TPP®	50 pacotes	17,90	895,00
Frasco (garrafa) cultura celular 75cm² c/ 10, TPP®	50 pacotes	17,10	855,00
		Total	90.238,20

Cronograma

[illegible]

Recursos financeiros disponíveis

Responsável	Projeto/Edital	Valor (R\$)
Flávio Fernando Demarco	Desenvolvimento de scaffolds injetáveis para engenharia tecidual da polpa dental	104.300,00
Flávio Fernando Demarco	Desenvolvimento de scaffolds injetáveis para engenharia tecidual da polpa dental	115.200,00
Flávio Fernando Demarco	Desenvolvimento e avaliação de biomateriais nanoestruturados em processos biológicos aplicados à área de saúde	28.000,00
Flávio Fernando Demarco	Desenvolvimento de scaffolds injetáveis para engenharia tecidual da polpa dental	7.200,00
Flávio Fernando Demarco	Utilização de Materiais Nanoestruturados em Processos Biológicos Aplicados a área de Saúde	1.149.529,20

Aspectos tecnológicos

Em caso de haver a geração de conhecimento com interesse comercial que por sua vez necessitarão de proteção intelectual, deverão as questões legais e de confidencialidade ser regidas pela Agência de Gestão Tecnológica da UFPel.

2. Relatório de trabalho de campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças realizadas na pesquisa, sugeridas pela banca examinadora do projeto de qualificação, realizada em setembro de 2011.

2.1 Título

Foi sugerida mudança no título, fazendo menção às características físico-mecânicas e comportamento biológico dos novos cimentos.

2.2 Introdução

Neste tópico algumas modificações foram requeridas, como deixar mais claro o objetivo e a importância deste trabalho.

2.3 Metodologia

As metodologias propostas que não foram incluídas no artigo final (Sorção e Solubilidade; Genotoxicidade), estão em andamento em nosso laboratório. Ainda, sugeriram-se metodologias adicionais como: tempo de presa, profundidade de polimerização e dureza dos materiais analisados. Estas podem ajudar a explicar alguns fenômenos observados durante a realização dos testes.

3 Artigo científico

Title: **Development of experimental cements for dentin-pulp complex**

Raquel Venâncio Fernandes Dantas, DDS¹; Marcus Cristian Muniz Conde, DDS, MS¹; Hugo Ramalho Sarmento, DDS¹; Cesar Henrique Zanchi, DDS, MS, PhD¹; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, DDS, MS, PhD¹; Fabrício Aulo Ogliari, DDS, MS, PhD¹; Flávio Fernando Demarco, DDS, PhD¹

Development of experimental cements for dentin-pulp complex

Keywords: Dental pulp; dental cements; pulp capping; biocompatibility; mechanical properties.

Abstract

Introduction: There is a need to develop new cements to optimize pulp therapy strategies. **Objective:** The aim of this study was evaluate physic-chemical and biological parameters of experimental cements (Hybrid, Paste and Resinous), including pH, diametral tensile strength and cytotoxicity of these experimental cements comparing them to MTA (Angelus®, Londrina, PR, Brazil) and a glass ionomer cement developed in our laboratory. **Methods:** For the physic-mechanical and biological tests specimens with standard dimensions were produced. For pH measurement, specimens were immersed in culture medium (DMEM) supplemented with FBS (fetal bovine serum) and analyzed by digital pH meter at 3, 24, 48 and 72h.

¹Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

For diametral tensile strength test the specimens were subjected to compressive load until the fracture. To evaluate cytotoxicity 3T3 cells were cultured and exposed to the cement eluates. The cell viability was detected using MTT test. The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$). **Results:** The Paste group showed pH values similar to the MTA, as well as the Hybrid group was similar to the GIC group ($p > 0.05$). All materials presented alkaline pH values or were near to neutrality on evaluated times. MTA and GIC showed similar strength results. The lowest and highest strength values were observed in groups Paste and Resinous, respectively ($p < 0.05$). Cell viability for MTA, Hybrid, Paste and Resinous groups, were 49, 93, 90 and 86% respectively, when compared to the control group. **Conclusion:** Considering this in vitro study, we concluded that the photo-cured Resinous experimental cement presented a performance similar or superior to the commercial or other experimental materials tested.

Introduction

Direct pulp capping relies on the application of a material directly on the exposed pulp, when it has a favorable condition (1), and indirect pulp capping is conducted in teeth with deep carious lesions and presenting reversible pulp pathosis, when the protective material is placed over a remaining layer of dentin (2). Both treatments aim to maintain the vitality of pulp tissue, which will continuously perform its biological functions (3).

Several materials are available in the Market to be used as capping agents, and among them calcium hydroxide (CaOH_2) has been one of the most used due to its properties to stimulate pulp repair, including dental pulp barrier formation, and having an antimicrobial effect caused by the high pH (4, 5). However, the CaOH_2 shows several limitations, with high solubility and short-term effect, rapidly buffered by dentinal tubule fluids, low mechanical resistance and lack of adhesion to dental structures (6).

Aiming to improve CaOH_2 cements, the incorporation of filler particles included in a urethane-dimethacrylate resin (UDMA) with photo initiators has produced a new material (Prisma VLC Dycal) that improved the mechanical properties of chemical cured calcium hydroxide cements, enhancing also the working time (5).

Nevertheless, the possibility of pulp damages decurrently of the uncured monomers release from resinous material was highlighted as a limitation for this photo-cured cement (7-10).

Mineral trioxide aggregate (MTA) was initially proposed for use in contact with periapical tissue, but nowadays it has also been indicated as a pulp-capping agent (11). Several investigations demonstrated that MTA have improved mechanical and biological properties when compared to calcium hydroxide cements (11-16). The better responses has been attributed to the higher solubilization produced by MTA over dentin, which could increase growth factors releasing (17). Despite the promising results observed, the handling characteristics and the long term required for material's hardening are considered limitations of the present formulations of MTA (18, 19).

Conventional glass ionomer cements have been indicated for protection of the pulp-dentin complex, presenting interesting properties, such as fluoride releasing, coefficient of thermal expansion and elasticity mode similar to dentin, and adhesion to dental structures. However, some limitations are related to these materials, including the high solubility, low mechanical properties and long time for setting (20). The addition of resinous compounds, like the 2-hidroxietil methacrylate (HEMA) to the conventional GIC improved the mechanical properties and resistance to wear (21); although, reducing the biocompatibility (22, 23), due to the releasing of uncured monomers that could cause pulp irritation throughout dentinal tubules (24).

To improve biocompatibility of resinous materials, new monomers have been proposed. The ethoxylated bisphenol A glycol dimethacrylate (Bis-EMA 30) presents a high molecular weight, impairing the possibility of monomeric diffusion though dentin. Since the diffusion coefficient is inversely proportional to the molecular weight, the replacement of HEMA (MW= 130g/mol) for Bis-EMA 30 (MW = 1,686g/mol) would result in toxicity reduction (25).

Even though several materials are indicating for capping procedures, there is not an ideal material incorporating all the advantages required for this protective indication. Therefore, the combination of different materials composition could be an interesting way to produce new dental cements that could put together the favorable properties of each one of the materials entering in the combination, which could improve the nowadays-available pulp therapy strategies (26).

The purpose of this study was to develop new experimental dental cements for pulp capping, combining compounds of different already existent commercial materials, including MTA. The tested hypothesis is that the experimental cements should exhibit better physic-chemical and biological properties, when compared to commercial materials.

Material and methods

The composition of MTA-based experimental materials (Hybrid; Resinous; Paste) employed in this study as well the White MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil) and the developed glass ionomer cement used in the Table 1.

pH Variation

For pH measurements 15 standard disks ($h=1\text{mm}$; $\varnothing=6\text{mm}$) were prepared for each material. After preparation, the disks were placed in eppendorf micro tubes with 1mL of culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM, SIGMA Chemical Co., St Louis - MO, USA) supplemented with bovine fetal serum (FBS) (Cultilab, Campinas - SP, Brazil), and stored at 37°C. The pH values were measured in different intervals: 3, 24, 48 and 72h after preparation, using a digital pHmeter (Quimis Q400A, Diadema, São Paulo, Brazil). In each measured interval the disks were carefully removed and placed in a new microtubule with liquid replacement (27).

Diametral tensile strength test

Standard disks ($h=2\pm0,1\text{mm}$; $\varnothing=4\pm0,1\text{mm}$) were prepared for each material evaluated ($n=8$). The borders were gently polished with grid-sandpaper (#600, Norton Abrasivos Brasil, São Paulo - SP, Brazil) and the samples were stored in distilled water at 37°C. After 24h, the disks were measured with digital paquimeter (Mitutoyo 500-144B, Suzano - SP, Brazil). The test was performed in a Universal testing machine (EMIC 2000, Equipamentos e Sistemas de Ensaio LTDA., São José dos Pinhais, PR, Brazil) under a 100Kgf load, at 0.5 mm/min. The resistance values were expressed in MPa.

Cell viability evaluation

An immortalized cell line, 3T3/NIH mice fibroblast, was cultivated in culture medium (DMEM) supplemented by 10% FBS and 1% of antibiotic (10.000UI/mL of penicillin G and 10.000 mg/mL de streptomycin, Gibco Laboratories Inc., Grand Island - NY, EUA). The cells were seeded in cultive dishes and maintained in an incubator (37°C, 5% of CO₂), until reaching sub confluence.

Standard disks (h=1mm; Ø=4mm) were prepared for each material (n = 2) and individually placed in an *eppendorf* micro tube containing 1mL of DMEM and stored in an incubator (37°C, 5% of CO₂) for 24h. After that, the samples were removed from micro tubes and the eluates from each material was obtained and added in 96-well plates (n=8), were cells (2x10⁴) have been previously seeded. The 96-well plates were incubated (37°C, 5% of CO₂) for 24h. Cell viability was assessed with the MTT assay. A control group was included with the containing only cells, without the eluates.

Readings were carried out using a universal ELISA reader (ELX 800, BIO-TEK Instruments, Winooski - VT, EUA), with a filter of 570nm wavelengths, where absorbance values were considered the indicator of cell viability. The inhibitory effect of the different tested materials on mitochondrial activity of cells was calculated and expressed in proportion rates, compared to control groups.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using the SigmaStat[®] software package (Version 3.5 for Windows[®], Systat Software Corporation, San Jose - CA, EUA) and analyzed descriptively. In addition, differences between groups were tested using ANOVA test and Tukey's test, with p <0.05.

Results

pH Variation

The pH means and standard deviations values of the tested materials are expressed in Table 2. Paste group showed pH values similar to MTA in all time

intervals tested. The Hybrid group had a performance similar to the glass ionomer cement ($p>0.05$). After 72h, most of the materials showed a pH reduction and the pH values were similar in this period of time. The Resinous group had statistically higher values after 72 hours ($p<0.05$) and this material has maintained the pH values similar during all the experiment. All evaluated materials have exhibited during tested periods alkaline pH values or at neutrality level (Figure 1a).

Diametral tensile strength test

In Figure 1b, the diametral tensile resistance values for different groups are exhibited. Data from Hybrid experimental group are not shown because material was completely solubilized during storage in distilled water for 24h, making impossible to test the material.

MTA and GIC showed similar values of resistance and the lowest resistance was observed for experimental group Paste ($p<0.05$). The experimental group Resinous exhibited the highest resistance values ($p<0.05$).

Cell viability assay

Cell viability for groups MTA, Hybrid, Paste and Resinous, when compared to control group, were respectively: 49, 93, 90 and 86% (Figure 1c). Data related to GIC group were not showed since complete cell depletion was observed (values equal to zero).

In Table 3, it is possible to observe the means, standard deviations and the comparison among groups regarding cell viability. Considering that GIC caused complete cell depletion, it was the most toxic material. MTA was the second more toxic material, with cell viability lower than the experimental cements ($p<0.05$). Between tested materials, the Hybrid had viability similar to the control group, while the other experimental materials (Paste and Resinous) had lower values compared to control ($p<0.05$). Noteworthy, all experimental materials had viability higher than 80% when compared to control group.

Discussion

In general, it was possible to observe that the experimental materials proposed had similar or superior properties compared to the MTA or GIC, partly confirming the hypothesis of the study. In this study, we have evaluated important physical properties (pH, diametral resistance) and biologic property (cytotoxicity), which are fundamental tools for initial screening of new materials (19).

In this study, MTA presented high pH values (alkaline) that initially were higher than for GIC and experimental cements, except for experimental group Paste. A high pH favors the antimicrobial effect of these cements (28, 29). While the mean pH values for MTA was similar to those found by (29) in the first 24 hours, there was significant decrease overtime.

The initial alkaline effect of MTA and Ca(OH)_2 seems to be the main reason for growth factors release from dentin, which accelerates the pulp repair process (17, 30). After 72 hours, the majority of materials suffered a reduction in pH values, tending to neutrality, demonstrating the initial release of ions and then the materials' stabilization. Noteworthy, the experimental material Resinous showed a stable pH value during the entire observation period. Such finding discloses the higher dimensional stability of resinous materials (21), evidencing that the alkalinity maintained high during the 72 hours observed, indicating that this material could have an important role in keeping the antimicrobial effect for longer periods (not tested in the study) and this higher alkalinity could allow a longer low intensity stimulation for growth factors releasing from dentin. Furthermore, the repair is favored in alkaline environment (31) and this could be relevant in those teeth where the pulp protection is placed due to deep caries lesions, because cariogenic microorganisms produce acids to demineralize dentin and these acids provide an unfavorable environment for pulp repair (6).

To evaluate pH from endodontic materials, usually rounded samples of 10 mm x 1 mm are used (29). Nevertheless, in this study, the samples dimensions were 1 x 6 mm, since tested materials are supposed to be used as pulp capping materials. The differences found in relation to the materials evaluated in relation to other studies could be due to the difference in sample size between studies.

The biocompatibility of dental materials is an important characteristic, because toxic compounds may cause pulp irritation and even tissue degeneration (32). When testing the cell viability, all experimental materials showed a lower toxic effect compared to MTA. The metabolic activity of cells in contact with MTA eluate

was 49% compared to control group (cells without contact with eluate), which disagree from previous report in literature, where rates near to 100% were observed (33, 34). The finding observed in our study might be due to the high pH value observed for MTA (9.26) after 24 hours that was the period when cytotoxicity was performed. Other studies found pH values for MTA around 12.0 (28, 35, 36). The diversity in relation to the results from our study and others in literature could also be attributed to the fact that while in other studies the DMEM was used without supplementation (33), in our study we used DMEM supplemented with 10% FBS aiming to better represent the environment where the cell viability would be evaluated.

In this study, the GIC showed a complete reduction of the cell viability, indicating that perhaps the material would not be applied in deep cavities or directly over the exposed pulp, without the apposition of another protective material. In fact, previous results in literature have already demonstrated showed that GIC should not be placed alone in deep cavities since it could cause conservative treatment failure (23). In spite of having in its composition an acid with high molecular weight (polyacrylic acid), the GIC still allow the acid releasing after material hardening, being possible the diffusion of acid through the dentin tubules with potential cell damage inside the pulp tissue (37). One study has demonstrated that during setting reaction, the pH from conventional GIC was lower than Zinc Phosphate cement or Zinc Polycarboxylate cement, and the authors also observed that GIC compounds could be released throughout dentin (38). Even though Hybrid experimental group had GIC in its composition; the material demonstrated the higher cell viability in relation to all other tested materials (93%). Such result suggests that this cement could have a potential for clinical use as stimulating agent.

The group Paste presented a lower cytotoxic compared to MTA. Perhaps the inclusion of a resinous compound (Bis-EMA 30) in the material composition was the reason for this good biological response observed. Bis-EMA 30 has a high molecular weight (25), limiting the release of eluate, reducing the material toxicity. The Resinous group showed cell viability similar to other experimental groups and near to the control group. The result could be related to the higher dimensional stability of this material that presented stable pH values during the experiment, indicating a lower release of ions initially, compared to MTA. This lower initial releasing could reduce the potential toxic effect over cells in culture. Moreover, it is important to

highlight that the resinous compounds in the composition have high molecular weight, with lower diffusibility from the inner restorative mass, reducing the potential toxicity (25).

Another important parameter in the materials characterization under development it is their resistance. In our study we evaluated the diametral tensile resistance that is used to test fragile materials, with low or none plastic deformation. In this test, the specimen is submitted to a compressive load in the diametral plane, perpendicular to longitudinal axe (39, 40).

The diametral resistance can be an important parameter for capping materials in cases where a restorative material requiring condensation, such as amalgam or packable composite, is placed over the capping material. The low diametral resistance of calcium hydroxide cement is one of its biggest limitations, due to the fact that they could not receive condensable restorative materials, without the interposition of another protective material (41).

Regarding diametral resistance, the GIC and MTA presented similar values. The observed values of resistance for these materials after hardening are stronger enough to allow the condensation of restorative materials (42, 43). Nevertheless, there is a considerable time for materials hardening for both the conventional GIC and for the MTA used in this study, which is an important clinical limitation, increasing the clinical time in the dentist's chair (44, 45). For example, in the case of conventional GIC it would remain for at least 8 minutes before other restorative procedures could be performed over it (20, 46), and for MTA the period of time to wait for additional restorative procedures is similar or longer (18, 19, 47).

In relation to experimental materials, the group Hybrid could not undergone testing, because all the specimens from this group were solubilized when stored in distilled water for 24 hours. Such characteristic could be interesting, if the material' dissolution is accomplished with the solubilization of dentin and releasing growth factors, resulting in improved pulp repair (17). However, the lack of resistance of the material, with its total dissolution could compromise its clinical application, because the material could disappear under the restorative material due to marginal leakage or presenting difficulties for restorative materials placement over the capping material, due its low resistance. As previously discussed, this is a limitation for the calcium hydroxide cements (48).

In relation to the experimental group Paste, the resistance values observed were lower than those from MTA and GIC, and also from experimental group Resinous. As already reported, this fact could be a clinical limitation for this experimental cement, producing a resistance lower than that required for packable composite application or amalgam condensation. For the Resinous experimental material the highest values (17.2 MPa) were observed compared to all other groups. The main reason for this finding is decurrently from the inclusion of resin components in the material formulation, in addition to the capacity of photo curing of this material, which provide an almost total mechanical resistance soon after light curing, being a relevant positive characteristic for a protective material and also reduces the total clinical time for the restorative procedure. Moreover, a material with higher diametral strength can present a higher resistance to degradation, ensuring a longer clinical life for the protective material, especially considering the deflection happening in the restorative material under masticatory loading, which could achieve the protective material (49). Recently, one study questioned the presence of materials/tissues of lower resistance under composite restoration in posterior teeth, because this could contribute to restoration fracture (49). It is important to point out that in the case of a protective material that obtain its highest mechanical values soon after photo activation, this material would not suffer the degradation caused by acid conditioning or by acidic primers application (50). Furthermore, a resinous capping material may have the additional advantage of chemical bonding with the composite resin used for restoration, minimizing the occurrence of failures at the capping material/restorative material interface (51).

In conclusion, taking into account all tests performed, it was possible to observe that the MTA-based resinous experimental capping material showed the overall best performance. These results could warrantee for the material a potential better clinical behavior.

Nevertheless, additional tests should be performed to confirm these promising initial results, including the use of the material in animal models in clinical use tests. All these aspects are being currently tested in our laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the research grants to the principal investigator (FFD) (processes #306187/2009-4; 480466/2009-2; 504921/2010-0; 508440/2010-6) and for the postgraduate fellowship (RVD) (process #551484/2010-1).

References

1. Tuna D, Olmez A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. *Int Endod J* 2008;41(4):273-278.
2. Camp J, Fuks A. Pediatric endodontics: endodontic treatment for the primary and young permanent dentition. In: Cohen S, Hargreaves K, editors. *Pathway of the Pulp*. 9th ed. St Louis, Mosby; 2006. p. 822–881.
3. Demarco FF, Rosa MS, Tarquínio SB, Piva E. Influence of the restoration quality on the success of pulpotomy treatment: a preliminary retrospective study. *J Appl Oral Sci* 2005;13(1):72-77.
4. Foreman PC, Barnes IE. Review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 1990;23(6):283-297.
5. Stanley HR, Pameijer CH. Dentistry's friend: calcium hydroxide. *Oper Dent* 1997;22(1):1-3.
6. Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int* 2001;32(3):211-220.
7. Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, et al. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 2005;50(5):469-479.
8. Baume LJ, Fiore-Donno G. Response of the human pulp to a new restorative material. *J Am Dent Assoc* 1968;76(5):1016-1022.
9. Stanley HR, Going RE, Chauncey HH. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. *J Am Dent Assoc* 1975;91(4):817-825.
10. Stanley HR, Swerdlow H, Buonocore MG. Pulp reactions to anterior restorative materials. *J Am Dent Assoc* 1967;75(1):132-141.

11. Leites A, Baldissera E, Silva A, Tarquinio S, Botero T, Piva E, et al. Histologic Response and Tenascin and Fibronectin Expression After Pulp Capping in Pig Primary Teeth With Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide. *Oper Dent* 2011.
12. Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127(10):1491-1494.
13. Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17(4):163-166.
14. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J* 2002;35(3):245-254.
15. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003;36(3):225-231.
16. Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod* 2003;29(5):324-333.
17. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007;35(8):636-642.
18. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod* 2006;32(3):193-197.
19. Chng HK, Islam I, Yap AU, Tong YW, Koh ET. Properties of a new root-end filling material. *J Endod* 2005;31(9):665-668.
20. Mount GJ. Buonocore Memorial Lecture. Glass-ionomer cements: past, present and future. *Oper Dent* 1994;19(3):82-90.
21. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater* 2000;16(2):129-138.
22. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 1999;48(3):277-288.

23. Aranha AM, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater* 2006;22(9):864-869.
24. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater* 2008;24(12):1702-1708.
25. Zanchi CH, Münchow EA, Ogliari FA, Chersoni S, Prati C, Demarco FF, et al. Development of experimental HEMA-free three-step adhesive system. *J Dent* 2010;38(6):503-508.
26. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod* 2010;36(11):1805-1811.
27. Tanomaru-Filho M, Chaves Faleiros FB, Saçaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2009;35(10):1418-1421.
28. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21(7):349-353.
29. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, et al. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod* 2011;37(6):844-846.
30. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006;27(14):2865-2873.
31. Elias RV, Demarco FF, Tarquinio SB, Piva E. Pulp responses to the application of a self-etching adhesive in human pulps after controlling bleeding with sodium hypochlorite. *Quintessence Int* 2007;38(2):e67-77.
32. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci* 2009;17(6):544-554.
33. Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. *J Endod* 2011;37(3):372-375.

34. Lessa FC, Aranha AM, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of White-MTA and MTA-Bio cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). *Braz Dent J* 2010;21(1):24-31.
35. Antunes Bortoluzzi E, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Endod* 2006;32(12):1194-1197.
36. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M. Sealing ability of a novel endodontic cement as a root-end filling material. *J Biomed Mater Res A* 2008;87(3):706-709.
37. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater* 2006;22(9):838-844.
38. Hiraishi N, Kitasako Y, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J, Nomura S. Acidity of conventional luting cements and their diffusion through bovine dentine. *Int Endod J* 2003;36(9):622-628.
39. Anusavice K. *Phillips: science of dental materials*. 11th ed. St. Louis; 2003.
40. Palin WM, Fleming GJ, Burke FJ, Marquis PM, Randall RC. The reliability in flexural strength testing of a novel dental composite. *J Dent* 2003;31(8):549-557.
41. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19(12):591-595.
42. Chong WF, Swartz ML, Phillips RW. Displacement of cement bases by amalgam condensation. *J Am Dent Assoc* 1967;74(1):97-102.
43. Brackett WW, Covey DA. Resistance to condensation of 'condensable' resin composites as evaluated by a mechanical test. *Oper Dent* 2000;25(5):424-426.
44. Nandini S, Ballal S, Kandaswamy D. Influence of glass-ionomer cement on the interface and setting reaction of mineral trioxide aggregate when used as a furcal repair material using laser Raman spectroscopic analysis. *J Endod* 2007;33(2):167-172.
45. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* 2005;38(11):834-842.
46. Kovarik RE, Haubenreich JE, Gore D. Glass ionomer cements: a review of composition, chemistry, and biocompatibility as a dental and medical implant material. *J Long Term Eff Med Implants* 2005;15(6):655-671.

47. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36(2):190-202.
48. Barnes IE, Kidd EA. Disappearing Dycal. *Br Dent J* 1979;147(5):111.
49. Opdam NJ, Bronkhorst EM, Loomans BA, Huysmans MC. 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *J Dent Res* 2010;89(10):1063-1067.
50. Bona AD, Pinzetta C, Rosa V. Effect of acid etching of glass ionomer cement surface on the microleakage of sandwich restorations. *J Appl Oral Sci* 2007;15(3):230-234.
51. Ruiz JL, Mitra S. Using cavity liners with direct posterior composite restorations. *Compend Contin Educ Dent* 2006;27(6):347-351; quiz 352.

Tables and Figure

Table 1- Composition of materials used in the study.

Materials	Composition	Type of cure	Proportion
Hybrid	Powder: composition of the powder GIC + MTA; Liquid: H ₂ O distilled + liquid of GIC	Chemistry	1:1
Resinous	Powder: MTA, Ytterbium Fluoride, DHEPT, EDAB; Liquid: PEGUDMA 400, TEGDMA, H ₂ O, GDMAP, UDMA, camphorquinone, benzoyl peroxide	Light cured	3:2
Paste	Paste 1: MTA, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, camphorquinone, DHEPT, EDAB; Paste 2: Ytterbium Fluoride, Bis-EMA 10, Bis-EMA 30, benzoyl peroxide	Light cured	1:1
Mineral Trioxide Aggregate (MTA, Angelus®)	Powder: Bi ₂ O ₃ , CaO, MgO, K ₂ O, Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , SO ₃ , SiO ₂ , Al ₂ O ₃ ; Liquid: distilled water	Chemistry	3:1
Glass Ionomer Cement (GIC)	Powder: crystals fluoraluminiosilicato radiopaque, polycarboxylic acid and pigments; Liquid: copolymers of polycarboxylic acids, maleic, itaconic, tartaric acid and purified water	Chemistry	1:1

GIC- glass ionomer cement; MTA- mineral trioxide aggregate; PEGUDMA 400 - 400 polietilenoglicol dimethacrylate, TEGDMA, triethyleneglycol dimethacrylate; GDMA-P-glycol dimethacrylate phosphide, UDMA, urethane dimethacrylate; DHEPT-N, N-dihidroxietyl-p-toluidine; EDAB ethyl-4-dimethylamino benzoate, polyethylene glycol Bis-EMA-dieter dimethacrylate; Bi₂O₃ dioxide-bismuth, calcium oxide, CaO, SiO₂, silicon oxide, aluminum oxide, Al₂O₃.

Table 2- Mean and standard deviation ($\pm$ SD) of pH for different materials stored in culture medium plus fetal bovine serum at the time intervals of 3, 24, 48 and 72 h.

	MTA	CIV	Paste	Hybrid	Resinous
3h	9.52 $A(\pm 0.16)^a$	8.02 $A(\pm 0.11)^d$	8.50 $AB(\pm 0.05)^{ab}$	8.20 $CD(\pm 0.14)^{cd}$	8.46 $AB(\pm 0.10)^{bc}$
24h	9.26 $AB(\pm 0.24)^a$	8.13 $A(\pm 0.40)^c$	8.96 $AB(\pm 0.13)^{ab}$	8.50 $AB(\pm 0.17)^c$	8.65 $AB(\pm 0.16)^{bc}$
48h	8.88 $AB(\pm 0.34)^a$	7.94 $A(\pm 0.68)^c$	8.27 $B(\pm 0.86)^{bc}$	8.47 $BC(\pm 0.27)^{bc}$	8.70 $AB(\pm 0.21)^{ab}$
72h	7.57 $B(\pm 0.52)^b$	7.38 $B(\pm 0.43)^b$	7.50 $BC(\pm 0.45)^b$	7.57 $D(\pm 0.68)^b$	8.89 $BC(\pm 0.25)^a$

Different letters denote statistically significant difference between columns and rows ($p < 0.05$). Capital letters should be considered in columns.

Table 3- Mean and standard deviation ($\pm$ SD) for cell viability in the different groups after 24 hours in contact with cements' eluates.

	MTA	Paste	Hybrid	Resinous	Control
24h	1.283 (± 0.158) ^c	2.242 (± 0.180) ^b	2.427 (± 0.239) ^{ab}	2.325 (± 0.191) ^b	2.598 (± 0.081) ^a

Different letters denote statistically significant difference ($p < 0.05$).

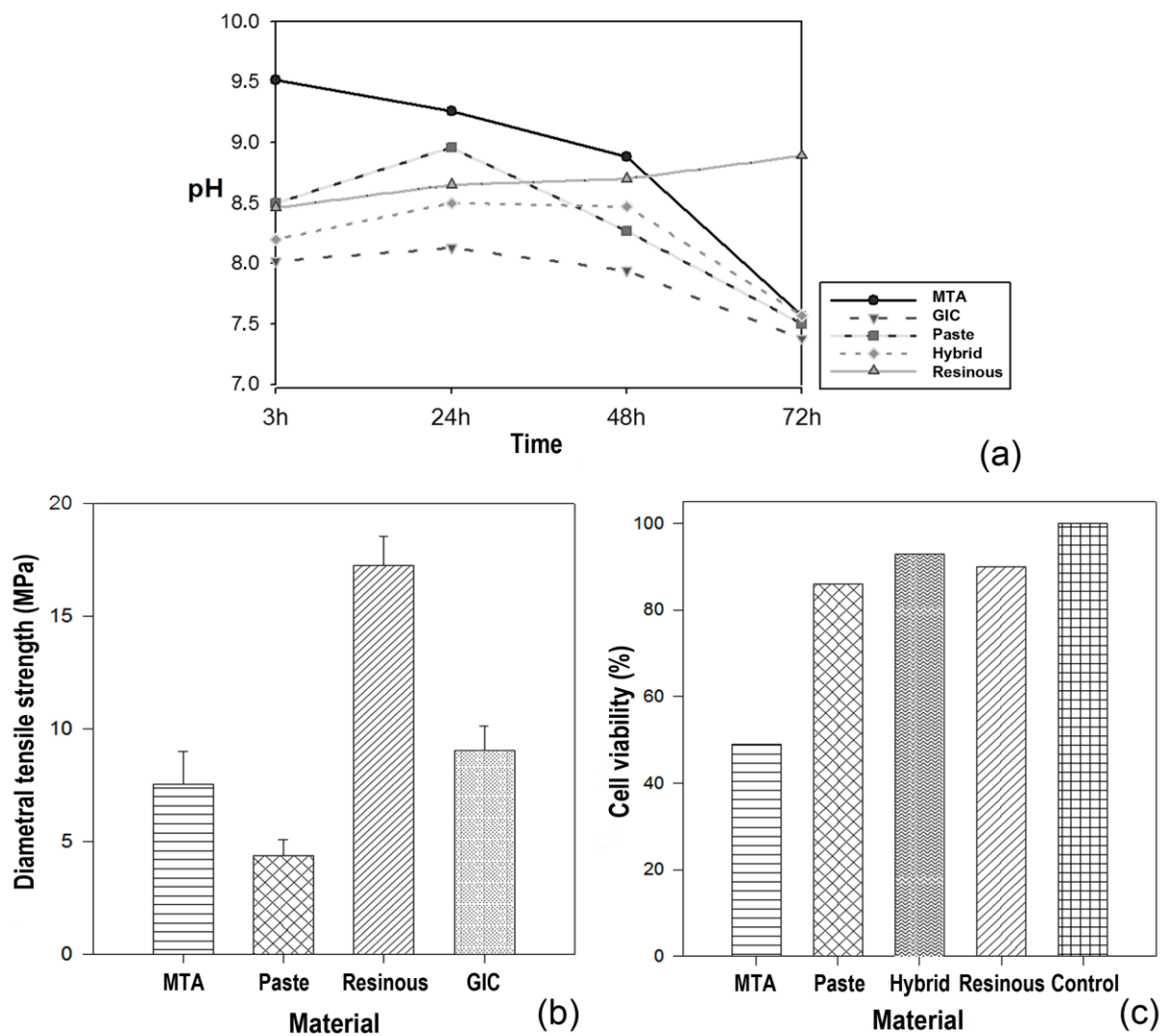


Figure 1. a) Results of the average pH of the materials in the time interval analyzed; b) Diametral tensile strength of cements; c) Cell viability after exposure to materials' eluates.

4 Conclusões

Diante dos resultados obtidos e da metodologia empregada, podemos concluir que:

- Todos os cimentos experimentais apresentaram valores alcalinos ou próximos da neutralidade, em todos os intervalos de tempo avaliados;
- Os materiais experimentais foram menos citotóxicos quando comparados ao MTA;
- O CIV ocasionou a depleção total das células, sendo o material mais tóxico;
- O cimento experimental resinoso apresentou desempenho similar ou superior aos materiais controles testados.

Referências

- AEINEHCHI, M.; ESLAMI, B.; GHANBARIHA, M.; SAFFAR, A. S. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 3, p. 225-31, Mar. 2003.
- ANUSAVICE, K. J. **Phillips: science of dental materials**. 11th ed. St. Louis: W B Saunders; 2003.
- AGAMY, H. A.; BAKRY, N. S.,; MOUNIR, M. M.; AVERY, D. R. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatric Dentistry**, v. 26, n. 4, p. 302-9, Jul./Ago. 2004.
- ARANHA, A. M. GIRO, E. M.; SOUZA, P. P.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C. A. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. **Dental Materials**, v. 22, n. 9, p. 864-9, Set. 2006.
- ARANA-CHAVEZ, V. E.; MASSA, L. F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 8, p. 1367-73, Ago. 2004.
- ASGARY, S.; SHAHABI, S.; JAFARZADEH, T.; AMINI, S.; KHEIRIEH, S. The Properties of a New Endodontic Material. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 990-993, Ago. 2008.
- BARNES, I. E.; KIDD, E. A. Disappearing Dycal. **Brazilian Dental Journal**, v. 147, n. 5, p. 111, Set. 1979.
- BARTHEL, C. R. ROSENKRANZ, B.; LEUENBERG, A.; ROULET, J. F.. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 9, p. 525-8, Set. 2000.
- BAUME, L. J.; FIORE-DONNO, G. Response of the Human Pulp to a New Restorative Material, **The Journal of the American Dental Association**, v. 70, n. 11, p. 1016-1022, Jun. 1968.
- BJØRNDAL, L.; MJÖR, I. A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence International**, v. 32, n. 9, p. 717-36, Out. 2001.

BRISO, A. L. RAHAL, V.; MESTRENER, S. R.; DEZAN JUNIOR, E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. **Brazilian Oral Research**, v. 20, n. 3, p. 219-25, 2006 Jul./Set. 2006.

BONA, A. D.; PINZETTA, C.; ROSA, V. Effect of acid etching of glass ionomer cement surface on the microleakage of sandwich restorations. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 3, p. 230-4, Jun. 2007.

BORTOLUZZI, E. A.; BROON, N. J.; DUARTE, M. A. H.; DEMARCHI, A. C. C. O. BRAMANTE, C. M. 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**, v. 32, n. 12, p. 1194-1197, Dez. 2006.

BRACKETT, W. W.; COVEY, D. A. Resistance to condensation of 'condensable' resin composites as evaluated by a mechanical test. **Operative Dentistry**, v. 25, n. 5, p. 424-6, Set-Out. 2000.

CAICEDO, R.; ABBOTT, P. V.; ALONGI, D. J.; ALARCON, M. Y. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. **Australian Dental Journal**, v. 51, n. 4, p. 297-305, Dez. 2006.

CAMILLERI, J.; MONTESIN, F. E.; DI SILVIO, L.; PITT FORD, T. R. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 11, p. 834-842, Jul. 2005.

CAMP, J. H.; FUKS, A. B. **Pediatric endodontics: endodontic treatment for the primary and young permanent dentition**. In: Cohen S, Hargreaves KM, eds. *Pathway of the Pulp*, 9th ed. St Louis, MO, USA: Mosby, pp. 822–81, 2006.

CHAN, C. P.; LAN, W. H.; CHANG, M. C.; CHEN, Y. J.; LAN, W. C.; CHANG, H. H.; JENG, J. H. Effects of TGF- β s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 50, n. 5, p. 469-79, Mai. 2005.

CHNG, H. K.; ISLAN, I.; YAP, A. U. J.; TONG, Y. W.; KOH, E. T. Properties of a New Root-End Filling Material. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 9, p. 665-668, Set. 2005.

CHONG, W. F.; SWARTZ, M. L.; PHILLIPS, R. W. Displacement of cement bases by amalgam condensation. **The Journal of the American Dental Association**, v. 74, n. 1, p. 97-102, Jan. 1967.

COSTA, C. A.; RIBEIRO, A. P.; GIRO, E. M.; RANDALL, R. C.; HEBLING, J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. **Dental Materials**, v. 27, n. 7, p. e158-70, Jul. 2011.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 41, n. 2-3, p. 321-32, Dez. 1976.

DAMAS, B. A.; WHEATER, M. A.; BRINGAS, J. S.; HOEN, M. M. Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 3, p. 372-375, Mar. 2011.

DEMARCO, F. F.; ROSA, M. S.; TARQUINIO, S. B.; PIVA, E. Influence of the restoration quality on the success of pulpotomy treatment: a preliminary retrospective study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 1, p. 72-7, Mar. 2005.

DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B.; JAEGER, M. M.; DE ARAÚJO, V. C.; MATSON, E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quintessence International**, v. 32, n. 3, p. 211-20, Mar. 2001.

DEMARCO, F. F.; CASAGRANDE, L.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; TARQUINIO, S. B.; ZEITLIN, B. D.; SHI, S.; SMITH, A. J.; NÖR, J. E. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1805-11, Nov. 2010.

DEMARCO, F. F.; CONDE, M. C. M.; CAVALCANTI, B. N.; CASAGRANDE, L.; SAKAI, V. T.; NÖR, J. E. Dental pulp tissue engineering. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 1, p. 3-13, Ago. 2011.

DEMARCO, F. F.; CORRÊA, M. B.; CENCI, M. S.; MORAES, R. R.; OPDAM, N. J. M. Longevity of posterior composite restorations: Not only a matter of materials. **Dental Materials**, Set. 2011.

DOMINGUEZ, M. S.; WITHERSPOON, D. E.; GUTMANN, J. L.; OPPERMAN, L. A. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 5, p. 324-33, Mai. 2003.

ELIAS, R. V.; DEMARCO, F. F.; TARQUINIO, S. B.; PIVA, E. Pulp responses to the application of a self-etching adhesive in human pulps after controlling bleeding with sodium hypochlorite. **Quintessence International**, v. 38, n.2, p. 67-77, Fev. 2007.

FARACO, I. M.; HOLLAND, R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. **Dental Traumatology**, v. 17, n. 4, p. 163-6, Ago. 2001.

FERNANDEZ, M. R.; CARVALHO, R. V.; OGLIARI, F. A.; BEIRA, F. A.; ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 2, p. 102-08, Fev. 2010.

FORD, T. R.; TORABINEJAD, M.; ABEDI, H. R.; BAKLAND, L. K.; KARIYAWASA, S. P. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **The Journal of the American Dental Association**, v. 127, n. 10, p. 1491-4, Out. 1996.

FOREMAN, P. C.; BARNES, I. E. Review of calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 23, n. 6, p. 283-97, Nov. 1990.

FRIDLAND, M.; ROSADO, R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 12, p. 814-7, Dez. 2003.

FRIDLAND, M.; ROSADO, R.; ENG, C. MTA solubility: a long term study. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 5, p. 376-9, Mai. 2005.

GOLDBERG, M.; SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 1, p. 13-27, Jan. 2004.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; GEHRON ROBEY, P.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, Dez. 2000.

GRAHAM, L.; COOPER, P. R.; CASSIDY, N.; NOR, J. E.; SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2865-73, Mai. 2006.

HILTON, T. J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-25, 2009 Set./Out. 2009.

HIRAISHI, N.; Kitasako, Y.; Nikaido, T.; Foxton, R. M.; Tagami, J.; Nomura, S. Acidity of conventional luting cements and their diffusion through bovine dentine. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 9, p. 622-8, Set. 2003.

ISLAM, I.; CHNG, H. K.; YAP, A. U. J. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 3, p. 193-7, Mar. 2006.

ISLAM, I.; CHNG, H. K.; YAP, A. U. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 3, p. 193-7, Mar. 2006.

KOPEL, H. M. The pulp capping procedure in primary teeth "revisited". **American Society of Dentistry for Children**, v. 64, n. 5, p. 327-33, 1997 Set./Out. 1997.

KOVARIK, R. E.; HAUBENREICH, J. E.; GORE D. Glass ionomer cements: a review of composition, chemistry, and biocompatibility as a dental and medical implant material. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 15, n. 6, p. 655-71, Ago. 2005.

LEITES, A.; BALDISSERA, E.; SILVA, A.; TARQUINIO, S.; BOTERO, T.; PIVA, E.; DEMARCO, F. Histologic Response and Tenascin and Fibronectin Expression After Pulp Capping in Pig Primary Teeth With Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide. **Operative Dentistry**, Ago. 2011.

LESSA, F. C. R.; ARANHA, A. M. F.; HEBLING, J.; SOUZA-COSTA, C. A.. Cytotoxic Effects of White-MTA and MTA-Bio Cements on Odontoblast-Like Cells (MDPC-23). **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 1, p. 24-31, Mar. 2010.

LINDE, A.; GOLDBERG, M. Dentinogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 4, n. 5, p. 679-728, 1993.

MAROTO, M.; BARBERÍA, E.; PLANELLS, P.; GARCÍA GODOY, F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **American Journal of Dentistry**, v. 18, n. 3, p. 151-4, Jun. 2005.

MASSI, S.; TANOMARU-FILHO, M.; SILVA, G. F.; HUNGARO DUARTE, M. A.; GRIZZO, L. T.; BUZALAF, M. A. R.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M. pH, Calcium Ion Release, and Setting Time of an Experimental Mineral Trioxide Aggregate-based Root Canal Sealer. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 844-846, Jun. 2011.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, Mai. 2003.

MIYASHITA, H.; WORTHINGTON, H. V.; QUALTROUGH1, A.; PLASSCHAERT, A. Pulp management for caries in adults: maintaining pulp vitality. **Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 2, p. Fev. 2007.

MODENA, K. C. S.; CASAS-APAYCO, L. C.; ATTA, M.T.; COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; SIPER, C. R.; NAVARRO, M. F. L.; SANTOS, C. F. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 6, p. 544-54, Mai. 2009.

MOUNT, G. J. Buonocore Memorial Lecture. Glass-ionomer cements: past, present and future. **Operative Dentistry**, v. 19, n. 3, p. 82-90, 1994 Mai./Jun. 1994.

NANDINI, S.; BALLAL, S.; KANDASWAMY, D. Influence of Glass-Ionomer Cement on the Interface and Setting Reaction of Mineral Trioxide Aggregate When Used as a Furcal Repair Material Using Laser Raman Spectroscopic Analysis. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 2, p. 167-172, Fev. 2007.

NAKASHIMA, M.; AKAMINE, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 10, p. 711-8, Out. 2005.

NICHOLSON, J. W.; CZARNECKA, B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. **Dental Materials**, v. 24, n. 12, p. 1702-8, Dez. 2008.

NÖR, J. E. Tooth regeneration in operative dentistry. **Operative Dentistry**, v. 31, n. 6, p. 633-42, Nov./Dez. 2006.

OPDAM, N. J. M.; BRONKHORST, E. M.; LOOMANS, B. C. A.; HUYSMANS, M. C. D. N. J. M. 12-year Survival of Composite vs. Amalgam Restorations. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 10, p. 1063-1067, Mai. 2010.

PALIN, W. M.; FLEMING, G. J.; BURKE, J. F.; MARQUIS, P. M.; RANDALL, R. C. The reliability in flexural strength testing of a novel dental composite. **Journal of Dentistry**, v. 31, n. 8, p. 549-57, Nov. 2003.

PALMER, G.; ANSTICE, H. M.; PEARSON, G. J. The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 303-11, Mai. 1999.

PASHLEY, D. H. Dynamics of the pulpo-dentin complex. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 7, n. 2, p. 104-33, 1996.

RUIZ, J. L.; MITRA, S. Using cavity liners with direct posterior composite restorations. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 27, n. 6, p. 347-51, Jun. 2006.

RUTHERFORD, B.; FITZGERALD, M. A new biological approach to vital pulp therapy. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 6, n. 3, p. 218-29, 1995.

SMITH, A. J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **Journal of Dental Education**, v. 67, n. 6, p. 678-89, Jun. 2003.

SOUZA, P. P. C.; ARANHA, A. M. F.; HEBLING, J.; GIRO, E. M. A.; SOUZA COSTA, C. A. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v. 22, n. 9, p. 838-844, Set. 2006.

STANISLAWSKI, L.; DANIAU, X.; LAUTI, A.; GOLDBERG, M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. 3, p. 277-88, Mai. 1999.

STANLEY, H. R. Trashing the Dental Literature- Misleading the General Practitioners: A Point of View. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 9, p. 1624-1626, Set. 1996.

STANLEY, H. R.; PAMEIJER, C. H. Dentistry's friend: calcium hydroxide. **Operative Dentistry**, v. 22, n. 1, p. 1-3, 1997 Jan./Fev. 1997.

STANLEY, H. R.; SWERDLOW, H.; BUONOCORE, M.G. Pulp Reactions to Anterior Restorative Materials, **The Journal of the American Dental Association**, v. 75, n. 1, p. 132-141, Jul. 1967.

TANOMARU-FILHO, M.; CHAVES FALEIROS, F. B.; SAÇAKI, J. N.; HUNGARO DUARTE, M. A.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 10, p. 1418-21, Out. 2009.

TÉCLÈS, O.; LAURENT, P.; AUBUT, V.; ABOUT, I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 1, p. 180-7, Abr. 2008.

TÉCLÈS, O.; LAURENT, P.; ZYGOURITSAS, S.; BURGER, A. S.; CAMPS, J.; DEJOU, J.; ABOUT, I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 2, p. 103-8, Fev. 2005.

TOMSON, P. L.; GROVER, L. M.; LUMLEY, P. J.; SLOAN, A. J.; SMITH, A. J.; COOPER, P. R. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 8, p. 636-42, Ago. 2007.

TORABINEJAD, M.; HONG, C. U.; MCDONALD, F.; PITT-FORD, T. R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 7, p. 349-53, Jul. 1995.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review- Part II: sealing ability and biocompatibility properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 2, p. 190-202, Fev. 2010.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 12, p. 591-595, Dez. 1993.

TUNA, D.; OLMEZ, A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 4, p. 273-8, Abr. 2008.

TZIAFAS, D.; PANTELIDOU, O.; ALVANOU, A.; BELIBASAKIS, G.; PAPADIMITRIOU, S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 245-54, Mar. 2002.

WITHERSPOON, D. E. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 7 Suppl, p. S25-8, Jul. 2008.

XIE, D.; BRANTLEY, W. A.; CULBERTSON, B. M.; WANG, G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. **Dental Materials**, v. 16, n. 2, p. 129-38, Mar. 2000.

ZANCHI, C. H.; MUNCHOW, E. A.; OGLIARI, F. A.; CHERSONI, S.; PRATI, C.; DEMARCO, F. F.; PIVA, E. Development of experimental HEMA-free three-step adhesive system. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. 6, p. 503-508, Mar. 2010.