

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E PROPRIEDADES
FÍSICO-MECÂNICAS DE UM CIMENTO EXPERIMENTAL DUAL
FOTOATIVÁVEL À BASE DE MTA**

Laura Siqueira Pintado

Pelotas, 2011

LAURA SIQUEIRA PINTADO

Citotoxicidade, genotoxicidade e propriedades físico-mecânicas de um cimento experimental dual fotoativável à base de MTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Odontologia, Área de concentração em Dentística.

Orientadora: Dra. Adriana Etges

Co – Orientador: Dr. Fábio Renato Manzolli Leite

Co – Orientador: Dr. Rodrigo Varella de Carvalho

Pelotas, 2011

Dados de Catalogação da Publicação

| | |
|---|-------------------------|
| P659c | Pintado, Laura Siqueira |
| Citotoxicidade, genotoxicidade e propriedades físico-mecânicas de um cimento experimental dual fotoativável a base de MTA / Laura Siqueira Pintado ; orientador: Adriana Etges ; co-orientador: Fábio Renato Manzolli Leite, Rodrigo Varella de Carvalho. – Pelotas: UFPel, 2011. | |
| 79 f. ; fig. ; tab. | |
| Dissertação (Mestrado) Dentística. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. | |
| 1. MTA. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. 4. Cultivo celular. 5. Fibroblastos pulpar. I. Etges, Adriana (orient.) II. Leite, Fábio Renato Manzolli (co-orient.) III. Carvalho, Rodrigo Varella de (co-orient.) IV. Título. | |
| D2 | |

Bibliotecário: Fabiano Domingues Malheiro CRB -10/1955

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Etges

CD. Dra. Beatriz Farias Vogt

Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Profa. Dra. Fernanda Geraldes Pappen (Suplente)

Dedicatória

À Deus,

Aos meus pais Eliana e Ricardo

Ao meu noivo Vitor,

Com amor e carinho

Agradecimentos

À **Universidade Federal de Pelotas** por meio do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Antônio César Gonçalves Borges.

À **Faculdade de Odontologia** através de sua Diretora, Profª. Drª. Márcia Bueno Pinto.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, em especial ao seu coordenador Prof. Dr. Flávio Demarco.

A minha orientadora, **Adriana Etges**, por proporcionar a realização desta dissertação, por ter me acolhido e aceitado receber uma nova orientanda, por mostrar-me os caminhos a serem seguidos para a finalização desta jornada. Obrigada pela confiança, ensinamentos e amizade.

Ao meu co-orientador **Fábio Renato Manzolli Leite**, pela sua presença em todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho, sempre disponível a ajudar, independente do horário ou do dia da semana. Obrigada por fazer parte deste trabalho e juntamente com a Adriana ter aceitado assumir a minha orientação e a realização deste projeto. Obrigada pela confiança, ensinamentos e amizade.

À minha colega **Eliana do Nascimento Torre**, agradeço pelo companheirismo, pela amizade, pelos conselhos, pelo ombro amigo, pelos ensinamentos e pela ajuda. Obrigada por estar sempre comigo, participando e colaborando no desenvolvimento desta pesquisa, pela paciência e pela amizade.

À todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela convivência e pelo aprendizado.

Ao **laboratório de Cultivo Celular**, a todos os **professores e funcionários** que nele trabalham. Obrigada pelos ensinamentos e ajuda.

A colega **Sônia**, pela colaboração, ajuda, ensinamentos em diversas etapas deste trabalho. Sempre com palavras acolhedoras , obrigada pela amizade

A **Fernanda Nedel.**, obrigada pelos ensinamentos na área de cultivo celular, pela paciência, dedicação, amizade e compreensão de mesmo em horários “alternativos” se mostrar sempre disponível para me ajudar.

Ao professor **César Zanchi**, pela contribuição com o material testado neste experimento.

À **Josiane Silva**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), por sua dedicação ao PPGO e aos alunos do programa.

A todos os **colegas** do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, pela agradável convivência e amizade.

À toda minha **família**, em especial aos meus pais **Eliana e Ricardo**, obrigada pelo apoio, compreensão, carinho, conforto e amor. Vocês são os grandes responsáveis por eu estar hoje concluindo este curso de mestrado.

Aos meus avós, **Estela, Marli e Selmar**, e a minha mana **Letícia** obrigada pelo apoio, amor e carinho e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu companheiro, **Vitor**, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, sempre me apoiando e confortando. Obrigada pelos momentos de paciência, pelos conselhos, pelo amor, pelo companheirismo e por acreditar em mim.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“... Não me abraçaste só no peito
Puseste a mão na minha mão
Eu pequenino- tu, eleito
Poeta, pai! Áspero irmão. ”*

Vinicius de Moraes

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 1. Estrutura tradicional, que consta no Apêndice A do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.edu.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf)

Resumo

PINTADO, Laura Siqueira. **Citotoxicidade, genotoxicidade e propriedades físico-mecânicas de um cimento experimental dual fotoativável à base de MTA.** 79f. 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Visando o sucesso do tratamento conservador da polpa, o MTA (agregado trióxido mineral) tem sido considerado o produto de primeira escolha para a realização de capeamento pulpar direto. Apresenta características como biocompatibilidade, capacidade de estimular a formação de dentina e proliferação celular, entre outros. No entanto, os inconvenientes como a dificuldade de manuseio após a manipulação e longo tempo de presa tem estimulado novas pesquisas na tentativa de melhorar essas características. Assim, um novo cimento fotopolimerizável baseado em MTA (MTA F) foi desenvolvido na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Sugere-se que a presença de monômeros resinosos pode ter um efeito deletério sobre a polpa dentária. Baseado neste fato, o estudo avaliou a citotoxicidade e genotoxicidade do MTA F em comparação ao convencional disponível no mercado bem como suas propriedades físico-mecânicas. Foram utilizadas culturas primárias de fibroblastos de polpa humana (FPH) e uma linhagem de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH. Polpa extraída de terceiros molares humanos íntegros foi utilizada para a cultura de fibroblastos pulpar. Os corpos de prova de ambos os materiais foram embebidos em 1 mL de DMEM para a obtenção do eludato teste. Para citotoxicidade, as células foram incubadas por 24 ou 48 horas com o eludato e avaliado pelo ensaio de MTT [3 - (4,5-dimetil-2-il) -2,5-brometo difenilterrazolim]. Para avaliar a genotoxicidade dos produtos através da técnica de micronúcleos, foi utilizada a técnica de coloração de Feulgen após a incubação de células por 24 horas com o eludato. Para a avaliação das características físico-mecânicas do MTA experimental foram realizados os testes de resistência a tração diametral e sorção e solubilidade. Os resultados foram analisados pelos testes ANOVA e Kruskal Wallis considerando $p < 0,05$. O MTA fotopolimerizável apresentou efeitos citotóxicos semelhantes ao MTA convencional nas duas linhagens celulares. O percentual de micronúcleos foi diferente entre os materiais, porém ambos foram semelhantes ao controle. A resistência a tração diametral do MTA experimental foi inferior ao MTA comercial. O MTA convencional foi mais solúvel e ambos tiveram o mesmo comportamento em relação à sorção de água. Os resultados sugerem que o MTA experimental fotopolimerizável teve comportamento e biocompatibilidade semelhante ao MTA disponível comercialmente, sendo um material promissor para o capeamento pulpar.

Palavras-chave: MTA, citotoxicidade, genotoxicidade, cultivo celular, fibroblastos pulpar.

Abstract

PINTADO, Laura Siqueira. **Cytotoxicity, genotoxicity, physical and mechanical properties of an experimental MTA based light-cure cement.** 79f. 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Aiming at the success of conservative pulp treatment, the MTA (mineral trioxide aggregate) has been considered the first choice product for performing direct pulp capping. It has features such as biocompatibility, ability to stimulate the formation of dentin and cellular proliferation, among others. However, drawbacks such as difficulty of handling after the manipulation and extended setting times stimulated new researches in an attempt to improve such characteristics. Thus, a light-cured cement-based MTA was developed at the CDC-BIO in the Faculty of Dentistry of the Federal University of Pelotas. It is suggested that the presence of resin monomers may have a deleterious effects on the dental pulp. Based on this fact, the study evaluated the cytotoxicity and genotoxicity of the experimental MTA compared with the conventional commercially available as well as their physical and mechanical properties. Primary cultures of human pulp fibroblasts (HPF) and one strain of mouse fibroblasts 3T3/NIH were employed. Pulp of extracted sound human third molars was used for the pulpal fibroblast cell culture. Specimens were made from the two materials and embedded in 1 mL of DMEM for obtaining the test eluate. For cytotoxicity, cells were incubated for 24 or 48 hours with the eluate and evaluated by the MTT assay [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]. To assess the genotoxicity of the products through micronucleus development the Feulgen staining technique was employed after cell incubation for 24 hours with the eluate. For the evaluation of physical and mechanical properties of the experimental MTA diametral tensile strength and sorption and solubility tests were performed. The results were analyzed by ANOVA and Kruskal Wallis tests considering $p < 0.05$. The light-curing MTA showed cytotoxic effects similar to conventional MTA in the two cell lineages. The percentage of micronuclei was different between the materials, but both were similar to control. The diametral tensile strength was lower for the experimental MTA. The conventional MTA was more soluble and both had the same behavior in relation to water sorption. The results suggest that the experimental light-cured MTA had similar behavior and biocompatibility comparable to the commercially available MTA and is a promising material for pulp capping.

Keywords: MTA, cytotoxicity, genotoxicity, cell culture, pulp fibroblasts.

Lista de Figuras

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Ensaio de compressão diametral (DTS). Força compressiva aplicada na lateral do disco que produz uma fratura por tração..... | 28 |
| Figura 2 | Estruturas moleculares do Bis-EMA com 4, 10 e 30 óxidos etilenos e a estrutura molecular do Bis-GMA..... | 32 |
| Figura 3 | Explants (setas brancas) e início da migração dos fibroblastos pulparés (a e b); FPHs em baixa confluência (c) e em 70% de confluência (aumento de 40 X) (d)..... | 37 |
| Figura 4 | a) Células 3T3 no inicio do cultivo (aumento 40X); b) 3T3 com 100% de confluência (20X); c, d) células com 70% de confluência(40X), observa-se a morfologia celular..... | 39 |
| Figura 5 | Matriz metálica utilizada para a confecção dos corpos de prova..... | 42 |
| Figura 6 | Corpo de prova imerso em 1 ml de DMEM para obtenção do eludato teste..... | 42 |
| Figura 7 | Núcleo e micronúcleo corados pela técnica de Feulgen..... | 46 |
| Figura 8 | Matriz metálica individual utilizada para a confecção dos corpos-de-prova. Na foto se observa a confecção de um corpo-de-prova com o MTA convencional..... | 47 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 9 | Viabilidade celular dos materiais testados com os FPHs, letras iguais resultados sem diferença estatística, letras diferentes resultados estatisticamente diferentes..... | 51 |
| Figura 10 | Viabilidade celular dos materiais testados com as 3T3, letras iguais resultados sem diferença estatística, letras diferentes resultados estatisticamente diferentes..... | 51 |
| Figura 11 | Média de MN encontrados por grupo em 1.000 células e comparação entre os grupos. Letras diferentes, grupos estatisticamente diferentes..... | 52 |
| Figura 12 | Resistência a tração diametral comparada entre os grupos..... | 53 |
| Figura 13 | Padrão de fratura apresentado. Foi semelhante nos dois grupos, apresentando fratura em apenas duas partes. MTA experimental e MTA convencional, respectivamente..... | 53 |

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Composição química do MTA experimental fotoativável dual testado..... | 41 |
| Tabela 2 | Média e desvio padrão de sorção e solubilidade para o MTA convencional e para o MTA experimental. Análise realizada por coluna. Diferentes letras subscritas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)..... | 54 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|--------------------|---|
| % | Percentual |
| μm | Micrômetro |
| μl | Microlitro |
| < | Menor |
| > | Maior |
| <i>et al.</i> | e outros |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| ANOVA | Análise de Variância |
| Bis-EMA | Bisfenol A polietileno glicol dimetacrilato |
| Bis-GMA | Bisfenol glicidil metacrilato |
| CaOH | Hidróxido de Cálcio |
| CP | Corpo-de-prova |
| CQ | Canforoquinôna |
| DHEPT | Dihidroxi-etil-p-toluidino |
| DMEM | Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco's |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DTS | Resistência à tração diametral |
| EDAB | Etil 4-dimetilamino benzoato |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGDMA | Etilenoglicol Dimetacrilato |
| FPH | Fibroblastos pulpare humanos |
| FO | Faculdade de Odontologia |

| | |
|--------|---|
| h | Hora |
| HEMA | 2-hidróxietil metacrilato |
| ISO | Organização Internacional para Padronização |
| mg | Miligramas |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MMP | Metaloproteinase da matriz extracelular |
| MN | Micronúcleos |
| MPa | Mega Pascal |
| MTA | Mineral Trióxido Agregado |
| MTA F | MTA dual fotoativável |
| MTT | Sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo] |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| s | Segundo |
| SFB | Soro fetal bovino |
| TEGDMA | Trietilenoglicol dimetacrilato |
| UDMA | Dimetacrilato uretano |
| UFPel | Universidade Federal de Pelotas |
| V | Volume |

Sumário

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Introdução | 17 |
| 2 | Objetivo..... | 20 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 20 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 20 |
| 3 | Revisão de literatura | 21 |
| 3.1 | Fisiologia pulpar | 21 |
| 3.2 | Materiais capeadores..... | 23 |
| 3.2.1 | MTA..... | 23 |
| 3.2.2 | Limitações do MTA..... | 28 |
| 3.3 | Monômeros resinosos..... | 30 |
| 4 | Materiais e métodos..... | 35 |
| 4.1 | Ensaios Biológicos..... | 35 |
| 4.1.1 | Técnica de cultivo primário de fibroblastos pulpare humanos | 35 |
| 4.1.2 | Cultivo da linhagem celular 3T3 | 38 |
| 4.1.3 | Contagem celular | 39 |
| 4.1.4 | Preparo dos corpos de prova a partir do MTA convencional e fotoativado | 40 |
| 4.1.5 | Teste de citotoxicidade..... | 42 |
| 4.1.5.1 | Teste de viabilidade celular (MTT) | 42 |
| 4.1.6 | Teste de genotoxicidade | 43 |
| 4.1.6.1 | Contagem de micronúcleos | 43 |
| 4.2 | Ensaios Físico- mecânicos | 46 |
| 4.2.1 | Resistência à tração diametral | 46 |
| 4.2.2 | Sorção e solubilidade | 48 |
| 4.3 | Análise estatística | 49 |

| | | |
|-------|--------------------------------------|----|
| 5 | Resultados | 50 |
| 5.1 | Citotoxicidade | 50 |
| 5.1.1 | Fibroblastos pulpareis | 50 |
| 5.1.2 | 3T3 | 50 |
| 5.2 | Genotoxicidade | 52 |
| 5.3 | Resistência à tração diametral | 53 |
| 5.4 | Sorção e solubilidade | 54 |
| 6 | Discussão | 55 |
| 7 | Conclusões | 64 |
| | Referências | 65 |
| | Anexos | 75 |

1 INTRODUÇÃO

O tratamento pulpar conservador tem por objetivo tratar injúrias reversíveis e manter a vitalidade e a função da polpa dentária. Dependendo do tipo de injúria dois tipos principais de tratamentos podem ser realizados, o capeamento pulpar direto e o indireto. O capeamento pulpar indireto é realizado em cavidades profundas, sem exposição pulpar, enquanto o capeamento pulpar direto e a pulpotomia são realizados em casos de exposição pulpar. O sucesso do tratamento depende do tipo e da localização da injúria, qualidade do tecido pulpar, idade dentária, tipo de material capeador utilizado e da integridade da cavidade restauradora (TZIAFAS, 2004).

Por muitos anos, o hidróxido de cálcio ocupou o posto de material de primeira escolha para a proteção e indução da polpa dentária em casos de exposição pulpar e cavidades profundas. Atualmente, no entanto, em casos de capeamento pulpar direto o material de primeira escolha tem sido o cimento mineral trióxido agregado (MTA) (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010b), visto que, é um material biocompatível (CAMILLERİ e PITT FORD, 2006; ROBERTS et al., 2008; PARIROKH e TORABINEJAD, 2010a), que apresenta resultados clínicos satisfatórios e até mesmo superiores ao hidróxido de cálcio (AEINEHCHI et al., 2003).

O MTA é um material efetivo para a realização de capeamento pulpar, pois estimula a formação de dentina reparativa formando tecido mineralizado osteóide no local do capeamento (TZIAFAS et al., 2002; CHACKO e KURIKOSE, 2006).

Apesar das favoráveis qualidades comprovadas em diversos estudos, defendendo a aplicação clínica do MTA, algumas de suas características têm sido citadas como limitantes por dificultarem sua aplicação. As limitações do MTA estão relacionadas à dificuldade de manipulação do material (ALANEZI et al., 2010; PORTER et al., 2010), tempo de trabalho reduzido (MATT et al., 2004; CHNG et al., 2005) e o tempo de presa considerado prolongado (CHNG et al., 2005; CHIANG e

DING, 2010; PARIROKH e TORABINEJAD, 2010b), variando em 50 minutos (KOGAN et al., 2006) até três horas (TORABINEJAD et al., 1995; PORTER et al., 2010). Neste sentido diversos autores sugeriram alterações na formulação do MTA convencional para diminuir o tempo de trabalho (BORTOLUZZI et al., 2006; KOGAN et al., 2006; BER et al., 2007; WATTS et al., 2007; BORTOLUZZI et al., 2009).

Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura objetivando melhorar as propriedades do MTA citadas anteriormente através da formulação de um MTA fotopolimerizável, os quais apresentam diferenças na composição como a adição de monômeros resinosos (GOMES-FILHO et al., 2008; GOMES-FILHO et al., 2010; GANDOLFI et al., 2011; GOMES-FILHO et al., 2011).

Com propriedades semelhantes ao MTA e buscando melhorar as propriedades clínicas de trabalho, como manipulação e tempo de presa, um cimento experimental à base de MTA foi desenvolvido na Faculdade de Odontologia da UFPel com a proposta de ser fotoativável e manter a sua reação de presa tradicional, sendo assim um cimento dual. O MTA dual fotoativado (MTA F) é composto por duas pastas, uma catalisadora e a outra ativadora, que ao serem misturadas iniciam o processo de presa química que pode ser concluída com a utilização do fotopolimerizador. Esse material foi desenvolvido para a realização de capeamento pulpar direto.

Porém, esse novo material apresenta em sua composição monômeros resinosos como o Bis-EMA 10 e o Bis-EMA 30, que entrarão em íntimo contato com a polpa dentária no momento do capeamento, podendo desencadear alguma reação de potencial citotóxico ou genotóxico sobre as células deste tecido, visto que esta é uma característica dos metacrilatos (GEURTSEN et al., 1998; SIDERIDOU e ACHILIAS, 2005; CHANG et al., 2010; NOCCA et al., 2010; KRIFKA et al., 2011).

Ensaios como resistência a tração diametral e sorção e solubilidade são testes freqüentemente empregados para a avaliação mecânica e física de materiais odontológicos (MORAES et al., 2010; GANDOLFI et al., 2011). A sorção de água e a solubilidade podem levar a uma variedade de processos físicos e químicos na estrutura dos monômeros que podem levar a efeitos deletérios na função e na estrutura dos polímeros dentais, incluindo sua capacidade retentiva na adesão dentária (MALACARNE et al., 2006).

Nesse sentido, o presente estudo pretende avaliar em cultivo primário de fibroblastos pulparas de dentes humanos e em uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH, as propriedades biológicas através do ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade deste cimento experimental fotoativado à base de MTA comparando-o com o MTA comercialmente disponível, bem como avaliar as propriedades físico - mecânicas através do teste de resistência à tração diametral e sorção e solubilidade.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar a biocompatibilidade de um cimento experimental à base de MTA dual fotoativável através de cultivo primário de fibroblastos pulpare humanos e de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH e suas propriedades físico-mecânicas, comparando as com o MTA comercial.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar se, tanto o MTA comercialmente disponível quanto o MTA dual fotoativável experimental apresenta potencial citotóxico sobre os fibroblastos pulpare cultivados e em uma linhagem celular imortalizada de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH.

Avaliar se, tanto o MTA comercialmente disponível quanto o MTA dual fotoativável experimental apresenta potencial genotóxico sobre os fibroblastos de camundongo 3T3/NIH.

Avaliar o valor de resistência à tração diametral do MTA dual fotoativável experimental comparado ao MTA comercial.

Avaliar o comportamento de sorção e solubilidade do MTA dual fotoativável experimental comparado ao MTA comercial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiologia pulpar

A polpa é um tecido conjuntivo não mineralizado e especializado originário da papila dentária e cercado por dentina. Durante a formação do órgão dental, células ectomesenquimais da periferia da papila dentária diferenciam-se em odontoblastos, as quais são as células responsáveis pela formação da dentina. A secreção de dentina ocorre ao longo de toda vida, sendo a dentina primária aquela secretada até a formação do ápice radicular; a dentina secundária, a camada formada após o fechamento do ápice radicular e, a dentina terciária, que pode ser de dois tipos: reacional e reparativa (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004)

A secreção de dentina terciária reacional é estimulada frente a fatores como atrição e cárie, constituindo uma tentativa dos odontoblastos de formar uma barreira, restabelecendo a espessura de dentina e afastando a polpa do estímulo agressor. A dentina terciária do tipo reparativa é formada por células indiferenciadas da polpa, originando um tecido tipo osteóide (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004). A dentina terciária do tipo reacional apresenta características anatômicas, químicas e funcionais semelhantes às dentinas primárias e secundárias (SMITH, 2002).

A polpa dentária é constituída pelos odontoblastos e uma região subodontoblástica que se divide na Zona Pobre em Células, Zona Rica em Células, além da Região Central da polpa. A Zona Pobre em Células é construída por prolongamentos das células subjacentes, vasos sanguíneos e fibras nervosas. A Zona Rica em Células é formada por fibroblastos (quase todos em estado de repouso) e células indiferenciadas (*stem cells*). A Região Central da polpa é constituída por um tecido conjuntivo frioso, com abundância de fibroblastos, presença de células indiferenciadas, células do sistema imunológico e colágeno (TEN CATE, 2001; KATCHBURIAN e ARANA, 2004).

A polpa dental apresenta também, células dendríticas que se localizam logo abaixo dos odontoblastos estendendo seus prolongamentos na Zona Pobre em Células. Possuem a função de capturar e apresentar o antígeno ao linfócito T. São mais numerosas em dentes cariados e estão em maior número que os macrófagos (TEN CATE, 2001). A identificação das células dendríticas pulpar levou a pesquisas sobre a atividade de resposta pulpar. Essas células não são capazes de identificar os抗ígenos estranhos, mas enviam sinais que ativam os linfócitos T, que irão desencadear o processo de defesa imunológico pulpar (JONTELL et al., 1998).

Os odontoblastos são células pós-mitóticas responsáveis pela secreção da dentina. São células sintetizadoras e secretoras de proteínas, principalmente de colágeno tipo I. Os odontoblastos permanecem funcionais e continuam secretando dentina ao longo da vida, porém em quantidade reduzida, mantendo sua capacidade de responder a estímulos ambientais leves. Quando estimulados, apresentam um aumento de sua atividade secretora levando à regeneração dentinária, podendo o estímulo ser de natureza exógena ou endógena (SMITH et al., 1995).

Em preparamos cavitários com exposição pulpar, no quais ocorre lesão tecidual, foi comprovada a proliferação, migração e diferenciação de células semelhantes a odontoblastos, levando a secreção de dentina reparadora (TECLES et al., 2005). Neste caso, as células endoteliais injuriadas são responsáveis pelo recrutamento de células semelhantes à odontoblastos para a região afetada (MATHIEU et al., 2005), uma vez que os odontoblastos primários são destruídos. O reparo se tornará possível quando novas células semelhantes aos odontoblastos forem recrutadas secretando dentina terciária na presença de material de capeamento pulpar (TZIAFAS et al., 2001).

Nesses casos, quando a polpa está livre de contaminação bacteriana e apresenta condições de reparo as células pulparas em contato com o material capeador proliferam e elaboram um novo colágeno em contato com a região pulpar necrótica iniciando a formação de dentina reparativa. Uma camada de células semelhantes à odontoblastos é formada em associação com uma calcificação superficial, secretando uma matriz mineralizada como pré-dentina (TZIAFAS, 2004).

3.2 Materiais capeadores

3.2.1 MTA

O MTA, mineral trióxido agregado, foi lançado no mercado na década de 90, desenvolvido com a função de material retro-obturador endodôntico, sendo seqüencialmente usado para capeamento pulpar, pulpotaenia, vedamento de perfurações radiculares entre outras funções (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010a). O MTA é comercializado nas cores branca ou cinza, sendo o MTA branco composto por cálcio, sílica, bismuto e oxigênio, enquanto o MTA cinza é composto por cálcio, sílica, alumínio, ferro, bismuto e oxigênio (CAMILLERİ et al., 2005). Ambos apresentam pH básico variando de 10 – 12, apresenta pouca solubilidade (TORABINEJAD et al., 1995) e excelente capacidade seladora na presença de umidade (TORABINEJAD et al., 1994; DANESH et al., 2006; MAROTO et al., 2007).

O hidróxido de cálcio é um material odontológico de capeamento pulpar amplamente utilizado na odontologia, considerado padrão ouro (HORSTED-BINDSLEV et al., 2003) porém apresenta algumas desvantagens como presença de canais na barreira de dentina formada, obliteração da câmara pulpar, alta solubilidade nos fluidos orais, falta de adesão e degradação após condicionamento ácido (COX et al., 1996; COX et al., 1998; COX et al., 2001). Além de apresentar comportamento instável no capeamento pulpar de dentes permanentes mais velhos (TZIAFAS et al., 2002).

A utilização do MTA para capeamento elimina algumas desvantagens do hidróxido de cálcio como solubilidade e infiltração. Sendo portanto, o MTA apropriado para o capeamento pulpar direto (DAMMASCHKE, WOLFF, et al., 2010).

O MTA é rico em óxidos de cálcio, que são convertidos em hidróxido de cálcio em contacto com fluidos dos tecidos (CAMILLERİ, 2008). O hidróxido de cálcio se separa em íons de cálcio e hidróxido, resultando em aumento do pH e liberação dos íons cálcio. Os íons de cálcio podem atravessar a membrana celular por despolarização ou ativação dos canais de cálcio ligado à membrana, portanto, é provável que esse íon apresente um papel no processo reparador melhor do que a hidroxila iônica, presente no hidróxido de cálcio. Os íons cálcio são necessários para a diferenciação e mineralização de células pulparas (TAKITA et al., 2006).

Quando comparado *in vivo*, o capeamento pulpar direto com MTA e hidróxido de cálcio, foi observado que o MTA cicatrizou o tecido pulpar mais rapidamente, porém em 60 dias ambos os materiais foram efetivos no tratamento capeador (ACCORINTE MDE et al., 2008).

Recente estudo *in vivo*, mostrou que o capeamento pulpar direto com o MTA apresenta biocompatibilidade, induz a formação de fibrodentina e dentina reparadora na superfície pulpar em contato direto com o material. Observaram que houve diferença significativa entre a resposta da polpa ao MTA após duas semanas e oito semanas de capeamento pulpar. Após duas semanas, as polpas capeadas com MTA mostraram a formação de matriz de dentina reparadora. Gradativamente, essa matriz foi calcificada com padrão tubular e as células odontoblástica se organizaram em forma paliçada, constituindo efetiva ponte de dentina. Após oito semanas havia menos inflamação no grupo do MTA, com um padrão em paliçada das células odontoblástica e uma espessa barreira de tecido duro com um padrão mais tubular. Este estudo comparou as propriedades do MTA com um cimento endodôntico (ZARRABI et al., 2010).

Outro estudo atual comparou histologicamente a resposta do hidróxido de cálcio, do MTA e da própolis em capeamento pulpar de pré-molares humanos. Seus resultados confirmaram a superioridade do MTA em relação ao CaOH, relacionada a produção de menor inflamação pulpar e formação de ponte de dentina com melhor qualidade. A própolis apresentou comportamento semelhante aos materiais capeadores comparados (PAROLIA et al., 2010).

Avaliando após seis meses o tratamento capeador em macacos, as polpas dos dentes capeados com MTA apresentavam ausência de processo inflamatório e a formação de ponte de dentina, em contraste com os dentes capeados com hidróxido de cálcio, nos quais as polpas apresentaram inflamação, não havendo formação de pontes de dentina em todos os casos (FORD et al., 1996).

O uso de MTA em caninos com cavidades classe V com exposição pulpar induziu mudanças citológicas e fisiológicas nas células pulparas, resultando na formação de dentina reparadora na região exposta da polpa dentária. O MTA oferece um substrato biologicamente ativo para as células pulparas, capaz de regular os eventos da dentinogênese. O efeito inicial do MTA na superfície da polpa

exposta foi a formação de uma camada superficial de estruturas cristalinas em contato com o material capeador. Células colunares com polarização nuclear e citoplasmática organizaram ao longo das estruturas cristalinas. Esta reação de curto prazo indica claramente a estimulação da atividade biossintética das células pulparas pelo processo de capeamento (TZIAFAS et al., 2002).

Outro estudo em roedores comparou a proliferação celular em molares de roedores com capeamento pulpar com MTA e hidróxido de cálcio. Em análise imunoistoquímica (DAMMASCHKE, STRATMANN, et al., 2010) e histológica (DAMMASCHKE, WOLFF, et al., 2010) observaram que ambos os materiais obtiveram resultados similares.

Estudos recentes, *in vitro*, demonstraram que o MTA apresenta menor citotoxicidade quando comparado ao cimento de hidróxido de cálcio em cultivo celular, além de estimular a formação de tecido ósseo (DE SOUZA COSTA et al., 2008; YASUDA et al., 2008; SEPET et al., 2009), bem como, maior capacidade de liberar íons cálcio e de induzir proliferação celular (MOGHADDAME-JAFARI et al., 2005; TAKITA et al., 2006). Porém o cimento de silicato dicálcio com óxido de bismuto apresentou maior viabilidade celular que o MTA branco em células humanas semelhantes à osteoblastos imortalizadas (MG63) (CHIANG e DING, 2010).

Crescente volume de estudos *in vitro* com o teste de citotoxicidade tem sido realizado por diversos autores com a finalidade de verificar a biocompatibilidade de um produto experimental através da comparação com o MTA comercialmente disponível. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com o MTA, o Endo-COM-Sealer e o Sealapex em fibroblastos de rato (L929). Nenhum dos materiais inibiu a viabilidade deste tipo celular (GOMES-FILHO et al., 2009), bem como o material obturador biocerâmico EndoSequence (ALANEZI et al., 2010).

Um cimento poliuretano à base de óleo de mamona teve sua citotoxicidade comparada ao MTA e ao cimento de hidróxido de cálcio. Foram utilizadas células pulparas de uma linhagem celular estabelecida. O cimento a base de mamona apresentou menor citotoxicidade que o MTA e o CaOH apresentou maior citotoxicidade que o MTA. O material testado apresentou maior proliferação celular quando comparado ao grupo controle, sem tratamento (CAMARGO et al., 2009).

O MTA foi capaz de permitir adesão, proliferação e migração de células mesenquimais cultivadas (hMSCs), apresentando após 14 dias proliferação celular maior que o grupo controle (D'ANTO et al., 2010). Em contato com células pulparas humanas, o comportamento biológico se repetiu com presença de biocompatibilidade e proliferação celular (TAKITA et al., 2006; PARANJPE et al., 2010).

Em cultura primária de fibroblastos do ligamento periodontal o MTA demonstrou diminuição da viabilidade celular em relação ao grupo controle, o que pode estar relacionado aos íons bismuto e alumínio, presentes no material, que podem ser tóxicos a este tipo celular (YAN et al., 2010).

Utilizando o teste de genotoxicidade, um ensaio *in vitro*, é possível avaliar as concentrações subletais que podem causar danos hereditários ao DNA celular. O dano ao DNA é o primeiro passo na carcinogênese (DA SILVA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). O teste de genotoxicidade é de grande importância de ser realizado antes da utilização de um material, visto que, muitos materiais dentários permanecem em contato com os tecidos orais por longos períodos. As propriedades do material e o tempo que permanecem em exposição podem ser fatores importantes que às atividades nocivas (RIBEIRO et al., 2004).

O MN consiste em massas de DNA com aparência de um pequeno núcleo localizado no citoplasma celular dependente da divisão celular, da quantidade e proliferação e da morte celular (DE ALMEIDA et al., 2004).

Materiais odontológicos resinosos têm sido identificados por apresentar algum potencial mutagênico. Contudo, a mutagenicidade não significa carcinogenicidade (capacidade de causar tumores) porque muitas mutações são reparadas e outras são até irrelevantes para causar doenças (ANUSAVICE et al., 2005).

O ensaio de MN é utilizado como um marcador biológico para avaliar o grau de comprometimento das células. Eles somente se expressam em células que completaram pelo menos uma divisão celular, após sofrerem ação do agente genotóxico. Freqüentemente a não incorporação destes fragmentos ocorre por não possuírem centrômero, e por isto não conseguirem migrar em direção aos pólos do fuso, permanecendo atrasados na anáfase. Estes fragmentos de DNA deixados para

trás são incorporados dentro de núcleos secundários, permanecendo no citoplasma celular (FENECH, 2000).

O MTA e o Cimento Portland tiveram seus efeitos genotóxicos testados em linfócitos periféricos humanos, que apresentam a vantagem de serem células humanas com cariótipo normal, pela técnica cometa. Ambos os materiais não aumentaram o nível de lesões ao DNA nesse tipo celular, segundo a técnica do ensaio cometa (BRAZ et al., 2006). Outros estudos semelhantes comprovaram que o MTA não apresenta efeito genotóxico (DA SILVA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006; ZEFERINO et al., 2010).

Um cimento de resina natural à base de óleo de mamona teve sua genotoxicidade comparada ao MTA e ao cimento de hidróxido de cálcio através do teste de contagem de MN. Foram utilizados fibroblastos de hamster chinês V79. Nenhum efeito genotóxico foi encontrado nos materiais testados (CAMARGO et al., 2009).

Assim como avaliações biológicas, como a citotoxicidade e a genotoxicidade, testes mecânicos também são amplamente realizados com os materiais.

O teste mecânico de resistência à tração diametral (DTS) avalia em mega pascal (MPa) a resistência à tração apresentada pelo material. Denominado teste de compressão diametral o método consiste na transferência de uma carga compressiva por uma placa plana na lateral de um corpo-de-prova (CP) curto, e cilíndrico (disco) no qual a força compressiva vertical ao longo da lateral do disco produz uma tensão de tração perpendicular ao plano vertical que passa pelo centro do disco, onde ocorre a fratura (Figura 1). O resultado confiável ocorre quando o CP se fragmenta em apenas duas partes (ANUSAVICE, 2005).

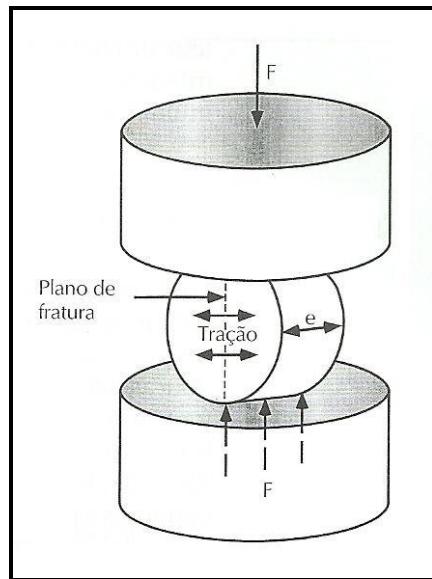


Figura 1. Ensaio de compressão diametral (DTS). Força compressiva aplicada na lateral do disco que produz uma fratura por tração (ANUSAVICE, 2005).

Chiang e Ding, em 2010 realizaram o teste DTS com o MTA branco comparando-o com um cimento de silicato dicálcio com ou sem a adição de óxido de bismuto. Os CP apresentavam 6mm x 4mm e foram armazenados em 100% de umidade a 37°C por 24h. O MTA convencional apresentou maior valor de DTS 7.4 MPa; os outros materiais apresentaram valores de 2.1 MPa e 1.8 MPa respectivamente (CHIANG e DING, 2010). Outros estudos encontraram o valor médio de DTS para o MTA branco após 24h de 4.4 MPa (HUANG et al., 2008; KAO et al., 2009) e imediatamente (0h) (SHIE et al., 2009). Após imersão em pH 6.4 por sete dias o valor de DTS para o MTA foi de 11.2 MPa e 7.9 MPa quando imerso em pH 4.0 por sete dias (SHIE et al., 2009).

3.2.2 Limitações do MTA

Algumas características do MTA têm sido citadas como limitantes por dificultarem sua aplicação. As limitações do MTA estão relacionadas à dificuldade de manipulação do material, tempo de trabalho reduzido e o tempo de presa prolongado. O pó do MTA é misturado com água destilada produzindo uma pasta com aspecto arenoso, sendo esta, difícil de ser aplicada no sitio desejado e de se

conseguir boa adaptação e compactação (KOGAN et al., 2006). Diversos autores sugerem alterações na fórmula do MTA convencional visando melhorar estas propriedades (KOGAN et al., 2006; BER et al., 2007; BORTOLUZZI et al., 2009; GANDOLFI et al., 2011; GOMES-FILHO et al., 2011)

Para diminuir o tempo de presa e melhorar as características de manipulação do material, um estudo adicionou ao MTA, lidocaína 2%, gel de hipoclorito de sódio 3%, gel de digluconato de clorexidina, gel K-Y e cloreto de cálcio 3% e 5%, comparando com água estéril. O tempo de presa do MTA com água estéril foi de 50 minutos, o hipoclorito, o gel K-Y e o cloreto de cálcio 5% diminuíram o tempo de presa para 20 minutos. A combinação MTA com gel de hipoclorito foi apresentou melhores características de manipulação, se assemelhando ao IRM (KOGAN et al., 2006).

Outros estudos, com os mesmos objetivos anteriores testaram a adição do cloreto de cálcio ao MTA, em associação com metilcelulose (BER et al., 2007), verificando que o cloreto de cálcio não interfere na sua capacidade seladora (BORTOLUZZI et al., 2006), diminui a solubilidade e aumenta o pH do MTA (BORTOLUZZI et al., 2009).

Gomes-Filho et. al., em 2008, publicaram um estudo com um MTA experimental fotoativável com propriedades semelhantes ao MTA convencional, porém com melhores propriedades de trabalho. Apresenta facilidade de aplicação e a polimerização permite secagem imediata. Constituído por aerosil 8%, resina 42%, MTA 44,5%, Basulfate 5%, componentes resinosos (Bis-GMA 20%, resina própria biocompatível [FDA] 77,25%, modificador 2,4%, iniciador 0,32% e estabilizador de iniciador 0,032%). Neste estudo, os autores avaliaram a capacidade e a habilidade do MTA experimental, comparado com o MTA (Angelus), em simular a mineralização em tecido subcutâneo de ratos. O MTA experimental apresentou moderada inflamação crônica em 30 dias enquanto o MTA (Angelus) apresentou leve inflamação crônica; em 60 dias apresentaram reação inflamatória semelhante. O MTA convencional promoveu calcificação distrófica nos tecidos adjacentes, formados pelos óxidos de cálcio presentes no material, enquanto o MTA experimental não estimulou formação de tecido ósseo (GOMES-FILHO et al., 2008).

Em 2010, foi feita uma avaliação do comportamento do MTA fotoativável em tubos de polietileno no alvéolo de ratos, comparando-o com o MTA (Angelus). Em 30 dias ambos os materiais, inclusive o controle apresentaram leve inflamação crônica. O grupo controle (sem material) não apresentou formação óssea, o MTA (Angelus) apresentou áreas de calcificação distrófica em contato íntimo com o material nos períodos avaliados e o MTA experimental não estimulou a formação de calcificação óssea, porém o tecido ósseo cicatricial estava em contato com o material separado por um tecido não-mineralizado. Bis-GMA presente no MTA experimental não interferiu na cicatrização alveolar após 90 dias (GOMES-FILHO et al., 2010). A mineralização pode ser retardada pela presença do bisfenol-alfa-metacrilato, um dos principais componentes do material, o qual é altamente solúvel, ou pelo aprisionamento dos óxidos de cálcio do MTA (GOMES-FILHO et al., 2011).

Gandolfi, et. al., em 2011, apresentaram um cimento fotopolimerizável de MTA com silicato de cálcio, voltado para utilização como material retro-obturador em cirurgia parendodôntica e aplicação em defeitos ósseos, buscando suprir a limitação do cimento de MTA de longo tempo de presa. O material desenvolvido é constituído por silicato de cálcio que constitui o pó e a parte líquida que é formada pelos monômeros HEMA e TEGDMA, mais CQ e EDAB. Neste estudo realizaram diversos testes tais como o ensaio de citotoxicidade, sorção e solubilidade, liberação de cálcio entre outros. No teste de citotoxicidade o MTA fotopolimerizável apresentou aumento da viabilidade celular como os demais grupos (ProRoot e controle) após 24horas, porém após três dias a viabilidade celular do ProRoot foi maior. O MTA fotopolimerizável apresentou baixa solubilidade e absorveu mais água que os demais materiais. Apresentou liberação de cálcio e estimulou a formação óssea (GANDOLFI et al., 2011).

3.3 Monômeros resinosos

O MTA experimental fotoativável é composto por duas pastas uma pasta base e uma ativadora. Cada uma destas pastas apresenta em sua composição 40% de Bis-EMA, sendo 20% de Bis-EMA 10 e 20% de Bis-EMA 30.

Monômero é denominado um composto químico capaz de reagir para formar um polímero. Os polímeros consistem em grandes moléculas orgânicas e quanto

mais longa a cadeia do polímero, maior é a quantidade de tramas entre as cadeias, portanto, mais difícil se torna distorcer o material polimérico, e assim, as características como rigidez, resistência e temperatura de fusão aumentam com o aumento da cadeia. Quanto maior a cadeia, maior o seu peso molecular (ANUSAVICE, 2005).

Biologicamente, a polimerização dos polímeros raramente é inteiramente completa, e desta forma, as moléculas dos monômeros residuais podem ser lixiviadas (devido seu baixo peso molecular) e causar reações adversas, como as reações alérgicas. Essa perda de monômeros leva a diminuição do peso molecular do polímero (ANUSAVICE, 2005).

Os polímeros são dissolvidos lentamente e raramente são solúveis ou insolúveis em algum líquido e quanto mais longa a cadeia mais lentamente um polímero dissolve. Os polímeros tendem mais a absorver um solvente, inchar e amolecer, do que a dissolver. As ligações cruzadas impedem a completa separação da cadeia e retardam a dissolução portanto polímeros com grande quantidade de ligações cruzadas não podem ser dissolvidos. As moléculas absorvidas afastam as cadeias poliméricas e facilitam o escorregamento das cadeias, esse efeito plastificante é chamado de plastificação. A ligação cruzada provê um número suficiente de pontes entre as macromoléculas lineares, para formar uma rede tridimensional que diminui a sorção de água e a solubilidade e aumenta a resistência e a rigidez da resina (ANUSAVICE, 2005).

Os dimetacrilatos surfactantes, apresentam dois grupos polimerizáveis formando polímeros com ligações cruzadas (C=C). Estes materiais têm a característica de reduzir a tensão de superfície, tornando mais fácil a mistura entre dois líquidos. São componentes orgânicos ambifílicos, pois contém tanto grupos químicos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos. Este comportamento bipolar é muito importante para a melhora dos sistemas adesivos, pois possibilita menor hidrólise devido à formação das ligações cruzadas, sem a perda de massa, produzindo propriedades melhoradas de penetração nas fibras desmineralizadas de colágeno na camada híbrida (ZANCHI et al., 2011).

O monômero Bis-EMA (bisfenol A etoxilado dimetacrilato) é um análogo dimetacrilato do Bis-GMA (2,2-bis [4 - (2-hidroxi-3-methacryloyloxypropyl) fenil] – propano) que pode apresentar diferentes tamanhos de cadeias e peso molecular, se caracterizam basicamente pela presença de dois radicais metacrilatos correspondendo ao grupo hidrofóbico e longas cadeias de óxido de etileno ($[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-]^n$) que são a parte hidrofílica da molécula. Estas longas cadeias estendidas de óxido de etileno propiciam grande flexibilidade a estes materiais, melhorando a mobilidade de todo o sistema (Figura 2).

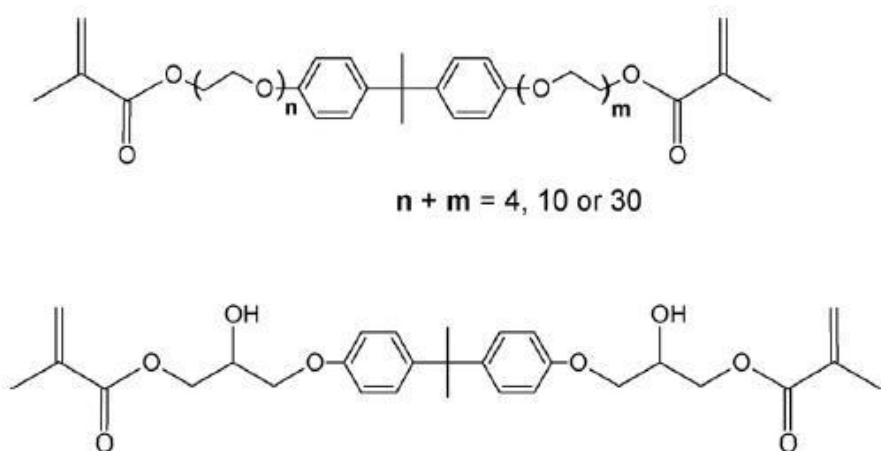


Figura 2 - Estruturas moleculares do Bis-EMA com 4, 10 e 30 óxidos etilenos e a estrutura molecular do Bis-GMA (OGLIARI et al., 2008).

O Bis-GMA consiste em um monômero dimetacrilato amplamente utilizado para criar a base de resinas de materiais dentários, apresenta rígida estrutura aromática a qual fornece adequadas propriedades mecânicas para os materiais, o que é necessário para obtenção de bons resultados clínicos. Porém a alta viscosidade do Bis-GMA diminui o grau de conversão dos monômeros na ausência de outros monômeros de baixa viscosidades. No entanto, quando se adiciona monômeros de baixa viscosidade como o TEGDMA ocorre aumento na contração de polimerização e absorção de água, o que pode prejudicar o desempenho clínico do material (OGLIARI et al., 2008).

O Bis-EMA apresenta menor viscosidade que o Bis-GMA, uma característica favorável para o desempenho dos materiais odontológicos. Neste estudo os autores

avaliaram a influência do tamanho da cadeia de monômeros do Bis-EMA sobre os perfis de polimerização. O Bis-EMA 30 apresentou maior taxa de convergência (82%) que os monômeros Bis-EMA 10 e Bis-EMA 4 (78, 3% e 59,4% respectivamente). Com relação a sorção de água o Bis-EMA 30 apresentou valor mais elevado (622,3) quando comparado ao Bis-EMA 4 e 10. Em relação a solubilidade o comprimento da cadeia foi significativo, o Bis-EMA 4 e 10 foram semelhantes (5,6 e 7,4, respectivamente) e inferiores ao Bis-EMA 30 (16,36). Os monômeros Bis-EMA 10 e 30 apresentaram alta elasticidade (OGLIARI et al., 2008).

O monômero HEMA, amplamente utilizado na composição de adesivos dentários, é um monômero pequeno, formado por apenas um grupo polimerizável o que o torna mais suscetível a hidrólise, podendo diminuir a resistência mecânica dos materiais e se difundir pelos túbulos dentinários causando inflamação pulpar (ZANCHI et al., 2010).

Com base nisto, um estudo buscou substituir o HEMA, de adesivos experimentais auto-condicionantes, pelo Bis-EMA 30, que por apresentar mais óxidos etílenos pode apresentar melhor comportamento biológico. A molécula do Bis-EMA apresenta dois extensores de cadeia longa de unidades de óxido de etileno que produzem um comportamento bi-polar, atuando como um agente de monômero de superfície ativa ou surfactante depende da relação de unidade polar/apolar. Quando foi utilizado em uma concentração de 40% do Bis-EMA 30 o adesivo experimental apresentou comportamento mecânico (micro tensão) semelhante ao adesivo comercial controle. A citotoxicidade diminui neste caso por diminuição da penetração do Bis-EMA nos túbulos dentinários (ZANCHI et al., 2010).

Um estudo avaliou as propriedades de diversas associações dos monômeros Bis-GMA, TEGDMA e Bis-EMA 4, buscando substituir o TEGDMA e em seu lugar associar o Bis-EMA 4 ao Bis-GMA. Dentre os ensaios, realizaram a tração diametral (DTS). Os autores observaram que formulações compostas por 30% ou mais de Bis-EMA em substituição ao TEGDMA diminuíram a resistência mecânica. O valor de DTS quando usado 100% de Bis-EMA foi de 28.9 MPa. Outro resultado que se mostrou bastante diferente do comportamento do TEGDMA associado com o Bis-GMA foi o teste de sorção, onde conforme o TEGDMA foi sendo substituído pelo Bis-EMA a sorção de água foi diminuindo (MORAES et al., 2010).

Geurtsen em 1998 avaliou a citotoxicidade de 35 monômeros resinosos em fibroblastos 3T3 e em cultivo primário de fibroblastos pulpare, gengivais e do ligamento periodontal. Os monômeros mais citotóxicos foram o UDMA, o Bis-GMA e o TEGDMA. O Bis-EMA apresentou menor citotoxicidade que estes monômeros acima mencionados (GEURTSEN et al., 1998).

A citotoxicidade de quatro resinas compostas (Z100, Solitaire 2, Filtek P60 e Synergy) foi avaliada nos fibroblastos 3T3, através do contato direto com as células por 72hs e com o eludato do extrato obtido pelo etanol destes compósitos. O teste colorimétrico MTT foi utilizado. O material mais citotóxico no contato direto foi a resina Solitaire 2 (Bis-GMA, TEGDMA, UDMA) e a menos citotóxica foi a Synergy (Bis-GMA, Bis-EMA, TEGDMA). No outro teste a resina Synergy apresentou maior citotoxicidade, não havendo diferença estatística entre os outros grupos. Esses resultados se devem devido à composição de cada material (DARMANI et al., 2007).

Em outro estudo foi avaliada a qualidade e a quantidade dos monômeros Bis-GMA, TEGDMA, UDMA e o Bis-EMA 4 extraídos com etanol das resinas Z100 e Z250. O monômero Bis-EMA de presa de 60s apresentou liberação crescente do monômero durante 30 dias. O Bis-EMA de presa de 100s apresentou liberação somente nos três primeiros dias, sendo semelhante ao TEGDMA e UDMA. Quando extraídos os monômeros das resinas observaram que quanto maior o tempo de polimerização menor a liberação dos monômeros. O Bis-EMA está presente somente na Z250, sendo liberado por 30 dias (SIDERIDOU e ACHILIAS, 2005).

Estudo com cultura primária de fibroblastos pulpare avaliou a citotoxicidade de 4 adesivos odontológicos, CMF Bond (Adesivo), Prime&Bond, Clearfil S (adesivo) e XP Bond. O adesivo CMF Bond foi o único que apresentou viabilidade celular semelhante ao grupo controle após 72h de teste, permitindo proliferação celular, o que pode ser explicado por este adesivo ser livre de TEGDMA e HEMA (TRUBIANI et al., 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (Parecer Nº 162/2010).

4.1 Ensaios Biológicos

4.1.1 Técnica de cultivo primário de fibroblastos pulparos humanos

Através do cultivo primário foi estabelecida uma linhagem celular de fibroblastos pulparos humanos (FPH), pela técnica de *explants* (FRESHNEY, 2000), para a avaliação da biocompatibilidade do MTA dual fotoativável experimental (MTA F) comparado com o MTA comercial (Angelus, Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil). Figura 3.

A linhagem celular foi estabelecida no Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (NCT-Bio/FOUFPel). Terceiros molares hígidos com rizogênese incompleta e com o ápice aberto, apresentando indicação de extração por motivos terapêuticos, foram extraídos na Unidade de Cirurgia de Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas e utilizados nessa pesquisa, para os quais os pacientes efetuavam doação, assinando termo de doação dos dentes para a pesquisa. Dois dentes, primeiramente, foram extraídos e imediatamente transportados para o laboratório, sob refrigeração em um falcon de 15ml contendo meio de transporte composto por Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco/Invitrogen-Lote: 563487) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco/Invitrogen- Lote:210120) e 1% de antibiótico (estreptomicina/penicilina, Gibco/Invitrogen-Lote: 847143). Na capela de fluxo laminar vertical (Quimis/ Série 041109) cada dente teve a sua polpa removida através do ápice radicular com o auxílio de curetas estéreis (Dentsply, nº 17). Após, os fragmentos pulparos foram lavados por duas vezes em PBS (Gibco/Invitrogen-

Lote:558182) e imersos em um meio de cultivo (DMEM + 10% de SFB + 1% de antibiótico).

Logo, em uma placa de Petri estéril o tecido pulpar foi fragmentado com o auxílio de duas lâminas de bisturi nº 15, em várias partes de aproximadamente 1 mm² cada. Esses fragmentos foram colocados em uma garrafa de cultivo celular (Techno Plastic Products) de 25 cm², de modo que se mantivessem aderidos ao fundo da garrafa. Nesta garrafa de cultivo com os fragmentos foi adicionado 1ml de meio de cultivo (DMEM + 10% de SFB + 1% de antibiótico) e logo foi levada a incubadora (estufa 5% CO₂ e 95% de O₂, Thermo Electron Corporation). Nas primeiras 72 horas, os fragmentos permaneceram em repouso, no interior da garrafa de cultivo, sem nenhum movimento nos frascos. Após este primeiro período, as garrafas foram monitoradas a cada 48/72 hs em microscópio de luz invertida (AAKER) para a observação da migração das células a partir dos *explants*. Nesse período, 1ml de meio de cultivo era adicionado, cuidadosamente a cada garrafa de cultivo. Os fragmentos não aderidos foram removidos. Após o início da migração das células, os *explants* foram descartados, e as células mantidas até a sua confluência na garrafa de cultivo, sempre em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias, de acordo com o metabolismo celular observado através da alteração de coloração do meio. As células foram subcultivadas quando atingiam uma quantidade maior que 70% da área cultivável do frasco, o que se denomina subconfluência. Para o subcultivo, a garrafa foi levada à capela de fluxo laminar, logo o meio de cultura do frasco foi removido com pipeta Pasteur estéril acoplada à bomba a vácuo (AspiraMax/ Indústria de Aparelhos Médicos Ltda). A pipeta foi apoiada no fundo da garrafa na parede oposta a área de cultivo para a succção do meio. A monocamada celular foi lavada uma vez com 3 ml de PBS, pH 7,2. Em seguida, o PBS foi sugado e as células separadas entre si e do fundo do frasco com a adição de 2 ml de solução de tripsina a 0,25% com ácido etienodiaminotetracético 1 mM (Gibco/Invitrogen –Lote: 794994) durante 5 minutos, a 37°C. Passados os 5 minutos a tripsina foi inativada com 4ml de meio de cultura contendo SFB reservado anteriormente e, as células em suspensão transferidas para um falcon de 15 ml. Com uma pipeta volumétrica o conteúdo do falcon foi ressuspenso para homogeneização. Alíquotas dessa suspensão de células foram distribuídas em duas novas garrafas de 25 cm²

contendo 5 ml de meio de cultivo suplementado com SFB a 10% e na garrafa de origem. Os frascos foram mantidos em estufa à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Cada procedimento de subcultura originou nova passagem da linhagem celular. As células usadas para os testes de citotoxicidade estavam entre a 5^a e 10^a passagem.

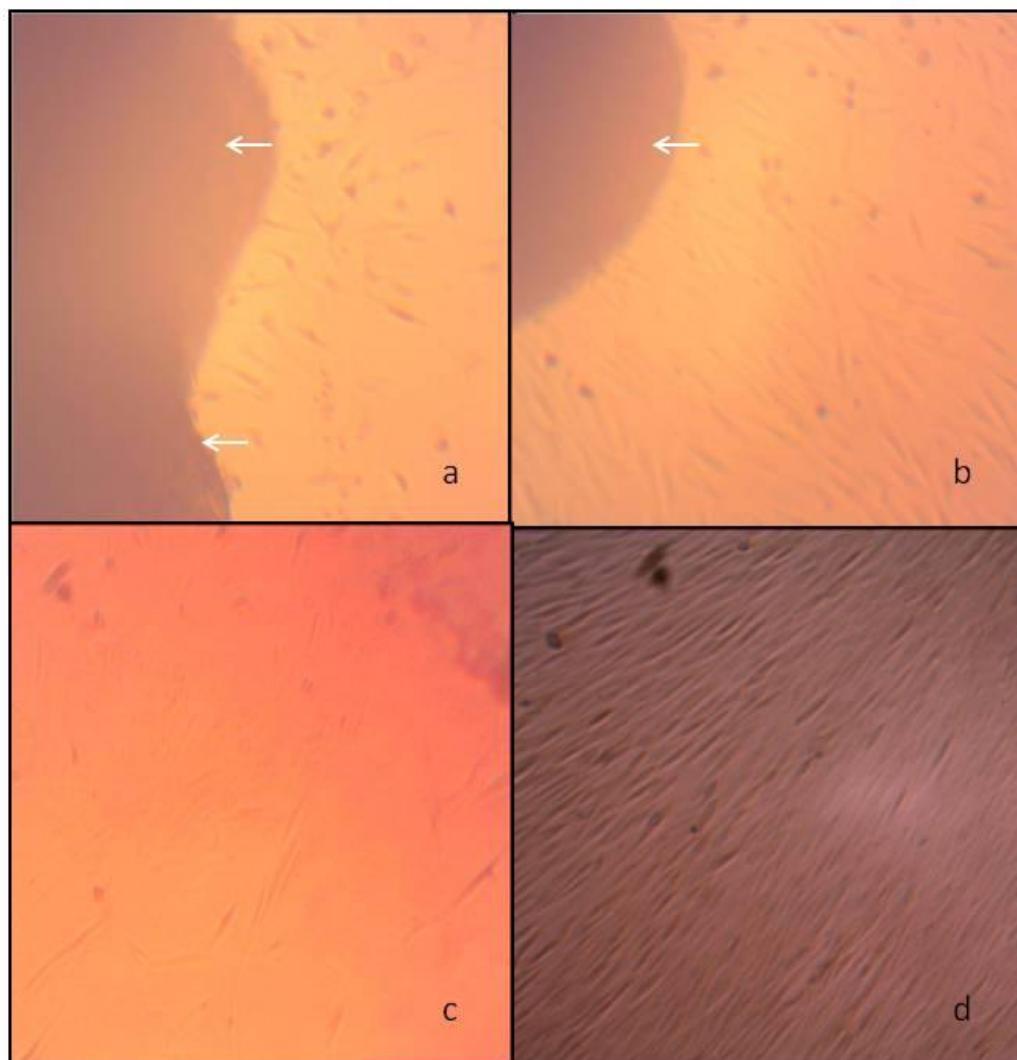


Figura 3. Explants (setas brancas) e início da migração dos fibroblastos pulpar (a e b); FPHs em baixa confluência (c) e em 70% de confluência (aumento de 40 X) (d).

4.1.2 Cultivo da linhagem celular 3T3

Fibroblastos de camundongo de uma linhagem estabelecida 3T3/NIH, foram descongelados, provenientes do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia (NCT-Bio/FOUFPel). Figura 4.

Para o descongelamento um tubo de criogenia graduado de 4,5ml (Techno Plastic, ref 89050) contendo a linhagem celular 3T3/NIH foi levado à temperatura de 37°C através da parcial imersão em banho-maria (Biopar, Mod BM 03) por cinco minutos e a seguir, dentro de capela de fluxo laminar vertical, o conteúdo foi adicionado a uma garrafa de cultivo celular de área de superfície 25cm² (Techno Plastic Products), a qual já continha 5ml de DMEM completo à temperatura de 37°C.

A garrafa de cultivo foi colocada em estufa de 5% CO₂ à 37°C e permaneceu por um período de três horas para promover a adesão celular no fundo da mesma. Após este período, o meio de cultura contendo DMSO (protetor criogênico) foi removido da garrafa com pipeta Pasteur estéril acoplada à bomba a vácuo (AspiraMax/Indústria de Aparelhos Médicos Ltda). Novo meio de cultura (DMEM, completo) foi adicionado à linhagem celular e esta permaneceu em atmosfera úmida, à 37°C, até obter-se a confluência de aproximadamente 70% da superfície cultivável da garrafa.

Procedimentos semelhantes aos descritos anteriormente de troca de meio de cultura e subcultivo foram realizados até a obtenção de um número satisfatório de células para realização dos experimentos com esta linhagem celular como explicado no item anterior para cultivo dos FPHs.

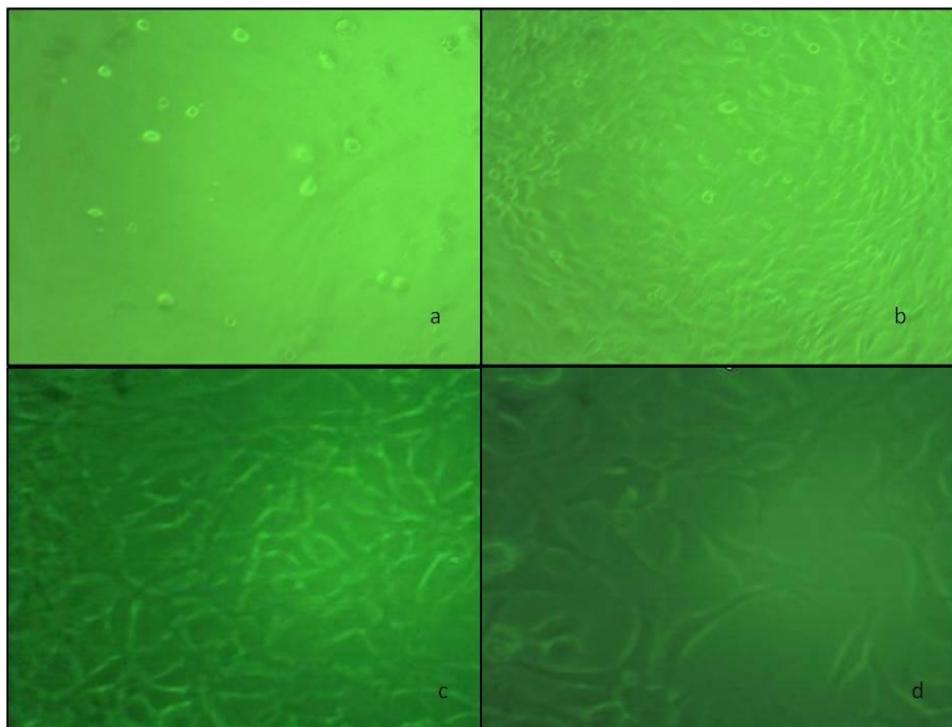


Figura 4. a) Células 3T3 no inicio do cultivo (aumento 40X); b) 3T3 com 100% de confluência (10X); c, d) células com 70% de confluência (40X), observa-se a morfologia celular.

4.1.3 Contagem celular

Antes da realização dos experimentos foi determinado o número de células existentes nos frascos de cultivo. A finalidade da contagem foi conhecer o número de células para uma divisão igualitária de células por grupo experimental. O número de células semeadas em cada placa de 96 poços foi de 2×10^4 , para o teste de citotoxicidade, e na placa de 24 poços de 4×10^4 células por poço, para o teste de genotoxicidade.

Para a determinação do número (contagem celular), o meio foi sugado com a pipeta Pasteur, as células foram lavadas uma vez em PBS e ressuspensas do seu substrato utilizando solução de tripsina a 0,25% em PBS e 1% de EDTA (Gibco/Invitrogen –Lote: 794994) por aproximadamente 5 minutos. Para inativação da tripsina 4 ml de meio com SFB foram adicionados às garrafas, como descrito na técnica de subcultivo. Após, o conteúdo total da garrafa utilizada no experimento foi removido e colocado em um falcon de 15ml. O volume de células com meio foi ressuspenso com a pipeta volumétrica para homogeneização das células no

sobrenadante. Dessa suspensão celular, 20 µL foram pipetados e em um hemocitômetro (Câmara de Neubauer Espelhada Melhorada/ Labor Optik), que logo foi levado ao microscópio invertido de fase para realização da contagem. As células com aspecto brilhante e formato arredondado foram consideradas viáveis, enquanto as células escurecidas com formato distorcido foram consideradas mortas, não sendo contabilizadas na contagem dos 4 quadrantes das extremidades. O cálculo foi feito com base na fórmula onde o número total de células viáveis contadas foi multiplicado por 10^4 . Esse valor foi dividido pelo número de quadrados contados (4) e multiplicado pelo fator de diluição (6ml). A partir da fórmula obtivemos a quantidade aproximada de células presentes em cada frasco.

O número total de células presentes no frasco foi obtido através da equação abaixo:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{número de células viáveis contadas} \times 10^4}{\text{número de quadrados usados para contagem}}$$

Após a determinação do número de células, uma quantidade de DMEM foi adicionada a suspensão para obter-se a quantidade desejada de células por volume para cada poço testado.

4.1.4 Preparo dos corpos-de-prova a partir do MTA convencional e do fotoativado

O MTA convencional (Angelus, Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil) e o MTA experimental fotoativado (MTA F) foram divididos em dois grupos e manipulados de acordo com as recomendações dos fabricantes. O MTA convencional (MTA C) foi espalulado em uma placa de vidro na proporção pó/líquido de 3:1, com o auxílio de um medidor. A tabela 1 mostra a composição química do MTA F. Para o MTA F, foram manipulados 4g de cada pasta do material, cada um dos ingredientes foi pesado, em balança de precisão, nas porcentagens indicadas. Logo após, foram confeccionados os corpos-de-prova em formato de pastilhas apresentando 5,5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura estabelecidos com o auxílio de uma matriz metálica circular (figura 5), os corpos-de-prova foram polimerizados

por 40s de cada face com fotopolímerizador (Radii Cal SDI). Uma matriz de poliéster foi colocada sobre os corpos de prova na matriz metálica circular antes da fotopolimerização, de ambos os lados do corpo-de-prova. O MTA convencional ficou estocado em um tubo plástico, a temperatura ambiente sem umidade, por 24 horas até a presa total, enquanto o MTA F ficou em média 20 horas estocado.

Tabela 1. Composição química do MTA dual fotoativável experimental testado.

| MTA dual fotoativável | |
|-----------------------|---------------------------|
| Pasta A | Pasta B |
| 60% MTA | 60% Itérbio |
| 20% Bis-EMA 10 | 20% Bis-EMA 10 |
| 20% Bis-EMA 30 | 20% Bis-EMA 30 |
| Iniciadores | Iniciadores |
| DHEPT 1% | Peróxido de benzoila 1,5% |
| EDAB 0,8% | |
| CQ 0,4% | |

Após tal período os corpos-de-prova foram esterilizados através da exposição à luz ultravioleta (MODARESZADEH et al., 2010; DAMAS et al., 2011) por duas horas (CHIANG e DING, 2010) sendo 60 minutos para cada lado da pastilha. Após, cada um dos materiais foi colocado em DMEM sem soro, em um volume de 1 ml cada, durante 24 horas, em tubos de criogenia (2ml, Eppendorf) (MODARESZADEH et al., 2010; YAN et al., 2010) em estufa a 37°C para o condicionamento do meio (DAMAS et al., 2011) (Figura 6). Passado o período, no interior da capela de fluxo laminar, os corpos-de-prova de ambos os materiais foram removidos dos tubos, com auxílio de pinça clínica para algodão estéril (Golgran). Os eludatos obtidos foram congelados em freezer - 80°C (Indrel/ IULT 335D) para posterior utilização nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade (GOMES-FILHO et al., 2009; ALANEZI et al., 2010).



Figura 5. Matriz metálica utilizada para a confecção dos corpos-de-prova.



Figura 6. Corpo de prova imerso em 1 ml de DMEM para formação do eludato teste.

4.1.5 Teste de citotoxicidade

4.1.5.1 Teste de viabilidade celular (MTT)

As condições de tratamento incluindo o cultivo e tempo de exposição foram baseadas nas especificações de International Standards Organization (1997).

A suspensão das células foi plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em placas de cultivo celular (ELISA/ Techno Plastic Products) de 96 poços. Cada poço recebeu 200 μl de DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico, onde se obteve o número de células descrito. As placas foram então incubadas à 37°C, em ar a 5% de CO₂, por 24 h com os fibroblastos 3T3/NIH e por 48h com os FPH, para promover a adesão celular ao

fundo dos poços (FRESHNEY, 2000). Passado o período, os 200 μ l de meio foram removidos e logo adicionados 200 μ l dos meios condicionados pelos materiais experimentais, com adição de 20 μ l de SFB por poço, em contato com as células nas placas de 96 poços (GOMES-FILHO et al., 2009; ALANEZI et al., 2010). Após a adição do eludato a placa foi colocada por cinco minutos no agitador Shaker (Biomixer/ TS-2000A UDRL Shaker) para homogeneização dos meios condicionados. As células do experimento ficaram em contato com o meio teste por 24 horas na incubadora de CO₂. Poços com DMEM sem a adição de células foram usados como controles brancos.

Após a remoção dos produtos teste, 20 μ l de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo] (Sigma/Aldrich) diluídos em 180 μ l de DMEM foram adicionados em cada poço sendo as placas incubadas em ambiente sem luminosidade por quatro horas à 37°C (GOMES-FILHO et al., 2009). A solução contendo MTT diluído em DMEM foi aspirada e 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO/ Synth) foram adicionados a cada poço e as placas novamente levadas à mesa agitadora a uma velocidade de 150 rpm por dez minutos para a solubilização dos cristais de formazan. Tais cristais são produzidos pela redução do MTT pela enzima desidrogenase succínica da respiração celular. Subseqüentemente, a absorbância foi aferida usando o espectrofotômetro (Termoplate/TP-Reader) em um comprimento de onda de 540 nm.

Foram utilizados três poços da placa para cada material teste e para o controle, nos quais foram adicionadas células com o meio de cultura, não sendo realizada troca pelo meio condicionado.

O experimento foi repetido três vezes com cada tipo celular em momentos independentes para confirmação dos resultados.

4.1.6 Teste de genotoxicidade

4.1.6.1 Teste de contagem de micronúcleos (MN)

OS ensaios de genotoxicidade foram realizados somente com a linhagem celular 3T3/NIH.

No interior da capela de fluxo laminar foram adicionadas 400 μ l de DMEM com SFB, após a contagem celular, onde se obteve 4×10^4 células/poço, em seis poços de uma placa de 24 poços (Techno Plastic Products). Antes da realização do plaqueamento, em cada poço a ser utilizado foi adicionada uma lamínula de vidro circular previamente esterilizada com 13 mm de diâmetro (G13C Glasscyto), onde a célula realizou a sua adesão, e posteriormente foi feita a contagem dos MN no microscópio. Todos os procedimentos foram realizados no interior da capela de fluxo laminar para manter a esterilidade. Após, a placa foi levada à estufa 37°C com 5% CO₂ e 95% O₂ por 24 horas com as 3T3. Passado o período de incubação o meio foi substituído em dois poços por 400 μ l do eludato formado pelo MTA F com adição de 40 μ l de SFB, outros dois poços por 400 μ l do eludato do MTA convencional, com adição de 40 μ l de SFB e nos outros dois poços denominado grupo controle foram adicionado 400 μ l de novo meio de cultivo (DMEM + 10% SFB), novamente a placa foi levada a incubadora, após ter ficado 5 minutos na mesa agitadora (Biomixer/ TS-2000A UDRL Shaker), por mais 24horas.

Passado o período de incubação, fora da capela de fluxo, os meios foram sugados dos poços e a cada um foi adicionado 300 μ l de PBS por 10s, para lavagem das lamínulas. As células foram fixadas, dentro do próprio poço, com 300 μ l de solução constituída por três partes de metanol (Vetec) para uma parte de ácido acético (Synth) e imediatamente foram levadas ao freezer -20°C (Consul 220) por 30 minutos. O protocolo utilizado para fixação e coloração foi adaptado de (FERNANDEZ *et al.*, 2010).

Passados os 30 minutos, o fixador foi sugado e adicionado ácido clorídrico 1N (Vetec) a temperatura ambiente durante um minuto, logo após, este foi substituído por ácido clorídrico pré-aquecido em banho-maria a 63°C (Techno Plastic, BMD01), a placa foi levada a estufa a 60 °C (Fanen) por dez minutos. Em temperatura ambiente aguardou-se dez minutos o resfriamento natural do conjunto para prosseguir. Sugou-se o ácido clorídrico e novamente se adicionou ácido clorídrico 1N a temperatura ambiente por cinco minutos. O ácido foi sugado e foram feitas duas passagens de cinco minutos de água destilada. Feito isto, a água foi sugada e as lamínulas foram mantidas em repouso até a completa secagem.

Iniciou-se então a coloração com a Técnica de Feulgen, que consiste na coloração de todos os elementos celulares que contenham DNA. O DNA após hidrólise ácida moderada, quando tratado pelo reagente de Schiff, dá lugar à formação de um produto que cora num tom de vermelho arroxeados.

A coloração do material nuclear foi realizada com Reagente de Schiff (ácido periódico de Schiff) por duas horas e trinta minutos à temperatura ambiente, em ambiente escuro. Após, o reagente foi removido e as lamínulas cobertas por água tamponada por quatro minutos sem luminosidade, a água tamponada foi removida e realizada lavagem com água destilada e remoção das lamínulas dos poços. Foi feita identificação das mesmas e repouso para secagem. Vinte e quatro horas depois as lamínulas foram imersas no corante Fast Green (Sigma-Aldrich) por 10 segundos, para obtenção da contra coloração do citoplasma, e depois lavadas em álcool (96%) por três vezes durante três segundos cada passagem. Para a visualização da reação em microscopia as lamínulas foram montadas em lâminas histológicas com Entellan (Merck KGaA), após 24h de secagem.

Os micronúcleos foram visualizados em microscópio óptico comum (CX 21 Olympus), com objetiva de 40x e oculares de 10x em lâminas identificadas de forma a cegar a leitura. A determinação da proporção de micronúcleos ocorreu mediante a contagem manual de micronúcleos em 1000 células por campo. Os experimentos foram repetidos por três vezes e analisados por dois avaliadores cegos.

Os critérios utilizados para caracterizar a formação dos micronúcleos foram os seguintes: (a) deve ter contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula; (b) apresentar coloração semelhante ao núcleo principal; (c) seu diâmetro deve ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) deve estar no mesmo plano de foco do principal; (e) deve estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos (COUNTRYMAN e HEDDLE, 1976).

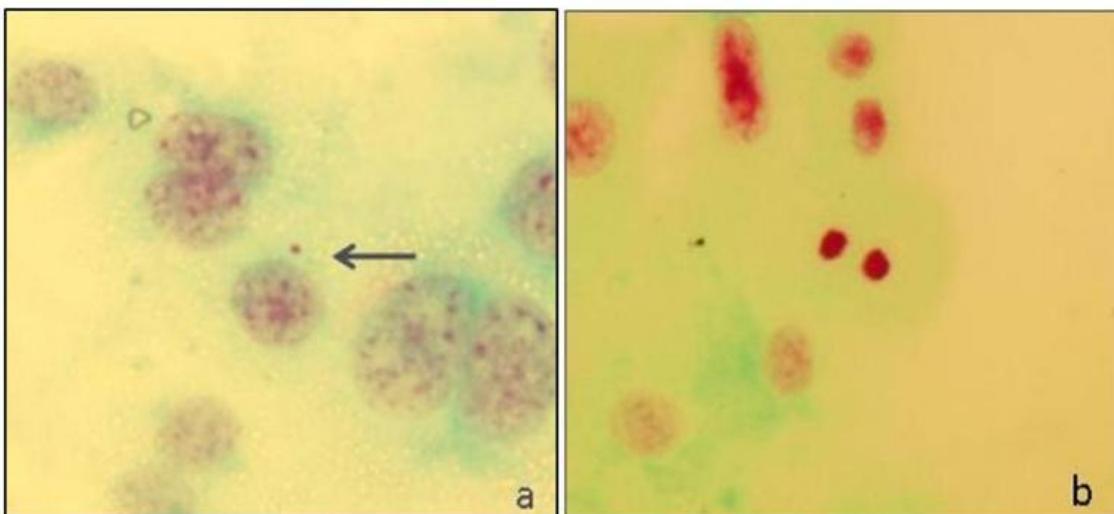


Figura 7. Célula micronucleada, MN (seta) de forma arredondada (a); um dos critérios de exclusão: cromatina condensada em duas células-filhas, pós –mitose (b).

Foi contado um número de 1.000 células por cultura e realizados dois cultivos por cada grupo testado, assim como preconizado por Kirsch-Volders et al., 2003 (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

4.2 Ensaios Físicos - Mecânicos

4.2.1 Resistência à tração diametral

Os corpos de prova foram preparados com o auxílio de uma matriz metálica circular bipartida tendo dimensões de 4 mm de altura e 2 mm de espessura (Figura 8).

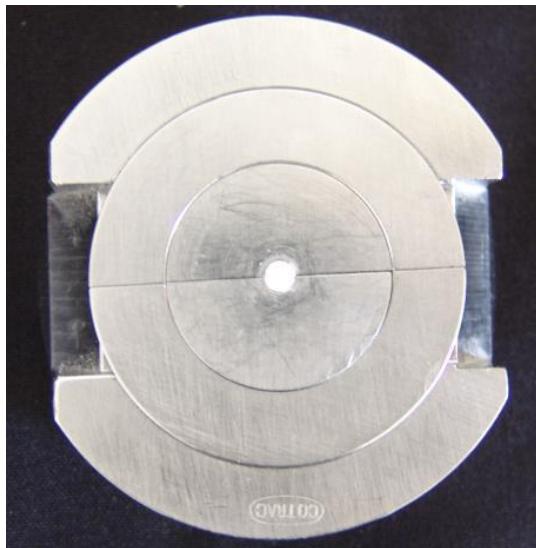


Figura 8. Matriz metálica individual utilizada para a confecção dos corpos-de-prova. Nota-se um CP com o MTA convencional em processo de confecção.

O MTA Angelus foi espatulado com água destilada na proporção pó/líquido 3:1. Os CP foram preparados individualmente e cada um permaneceu 15 minutos na matriz para posterior remoção, evitando a sua fratura. O MTA F foi preparado na quantidade de quatro gramas de cada pasta. Para a confecção de cada CP foi pesado 0,060g (Balança de precisão, AW220D; Shimadzu) de cada pasta. Os espécimes foram polimerizados por 40 segundos de cada lado, cobertos com uma matriz de poliéster.

Depois de removidos da matriz, os CP, de ambos os materiais foram individualmente armazenados em solução de água destilada a 37°C por 24 horas. Os espécimes do MTA F foram lixados e polidos em lixa 600 (Norton S.A., São Paulo, SP, Brasil). As dimensões dos CP foram medidas, considerando diâmetro e espessura, com um paquímetro digital (Mitutoyo, Tokio, Japão, 0.01mm precisão) e então submetido ao teste.

Os valores de resistência à tração diametral foram realizados em uma máquina universal (Emic DL-500, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com uma carga de 1000 N e velocidade de 0.5mm/minuto. Foram testados 11 espécimes de cada grupo. Os espécimes foram posicionados verticalmente na máquina para aplicação da carga compressiva.

4.2.2 Sorção e solubilidade

Para realização dos testes foram confeccionados dez CP do MTA C (Angelus) e dez CP do MTA F, com as mesmas proporções, características de manipulação e matriz metálica de cinco unidades cilíndricas de 5,5mm X 1mm descritas no item 4.1.4.

Depois de preparados, todos os CP tiveram seus quatro cantos e o centro medidos com um paquímetro digital (Mitutoio, Tokio, Japão, 0,01mm precisão), na qual uma média foi calculada para determinar o volume (V) em mm^3 . Cada CP foi armazenado individualmente em tubo de criogenia (Eppendorf) aberto em um dessecador contendo sílica a 42°C. Foram repetidamente pesados em intervalos de 24horas, em uma balança analítica digital (AW220D; Shimadzu) até a estabilização da massa, obtendo-se o valor de m_1 .

Após, cada CP foi imerso em 1 ml de água destilada e armazenado a 37°C durante sete dias. Ao final dos sete dias os espécimes foram removidos e secos com papel absorvente e novamente pesados para obtenção da massa úmida (m_2). Então os espécimes foram recolocados no dessecador a 42°C até nova estabilização da massa para obtenção de m_3 .

A sorção de água (WS) e a solubilidade (SL) foram calculadas em mg/mm^3 , através das seguintes fórmulas:

$$\text{WS} = \frac{(m_2 - m_3)}{V}$$

$$\text{SL} = \frac{(m_1 - m_3)}{V}$$

4.3 Análise estatística

Os resultados dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram submetidos ao método estatístico baseado no modelo de distribuição normal e igualdade de variância considerando-se o valor de $p \leq 0,05$ como estatisticamente significante.

O programa utilizado foi o Sigma Stat 3.5, e o teste utilizado ANOVA e Kruskall Wallis.

Para os testes de resistência a tração diametral e sorção e solubilidade o teste estatístico utilizado foi a análise de variância One-way ANOVA e Tukey para realizar a análise comparativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade

Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos independentemente três vezes para cada tipo celular (FPH e 3T3/NIH). Em todos os ensaios os valores foram expressos em porcentagem nos quais o valor do controle (sem tratamento) foi equivalente a “1”, sendo os demais grupos comparados a este através dos dados normalizados.

Os dados são apresentados como a percentagem média das absorbâncias para cada sistema de teste e o valor da mediana de cada triplicata foi dividido pelo valor da absorbância do controle do respectivo teste, obtendo-se assim, as percentagens de cada MTA testado dentro dos independentes experimentos.

5.1.1 Fibroblastos pulpares humanos

A viabilidade celular entre o MTA C e o MTA F não apresentou diferença estatisticamente significante, porém o MTA F apresentou desempenho mais favorável quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

5.1.2 Fibroblastos 3T3

A viabilidade celular entre o MTA C, o MTA F e o grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significante (Figura 10).

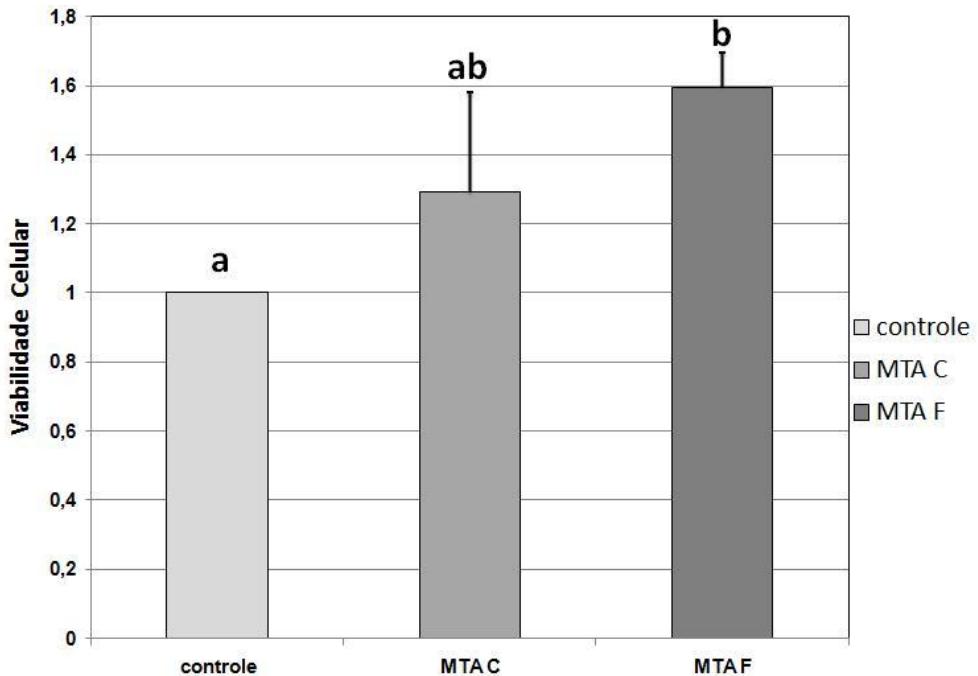


Figura 9. Viabilidade celular dos materiais testados com os FPHs, letras iguais resultados sem diferença estatística, letras diferentes resultados estatisticamente diferentes.

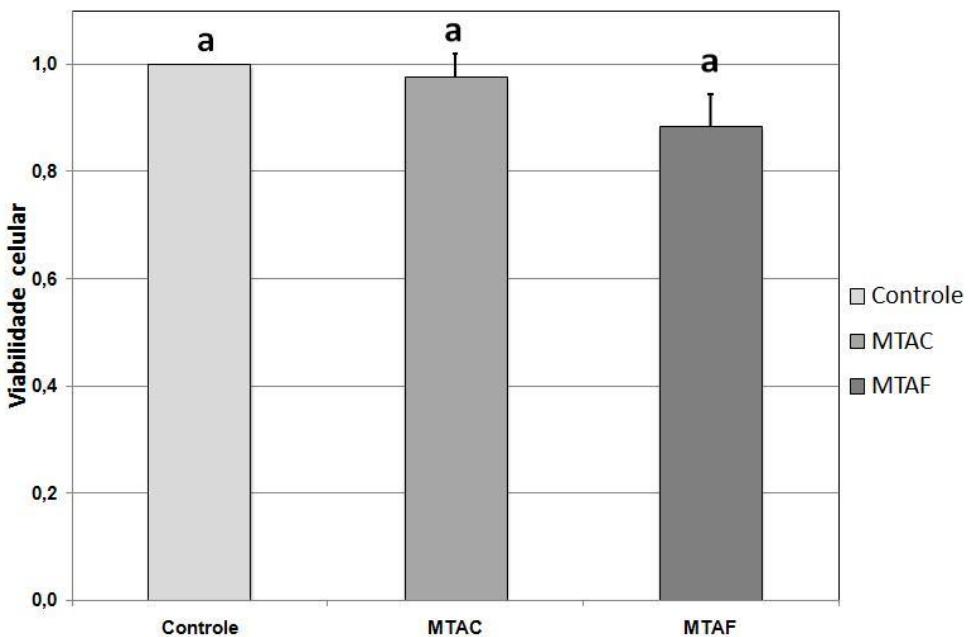


Figura 10. Viabilidade celular dos materiais testados com as 3T3(NIH), letras iguais resultados sem diferença estatística.

5.2 Genotoxicidade

A contagem de micronúcleos (MN) obteve 1.000 células por lamínula, começando da parte superior esquerda do campo e seguindo no sentido horizontal. As lâminas foram cegadas e contadas por dois examinadores diferentes para confirmação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes com duas lamínulas cada.

O MTA C e o grupo controle (sem tratamento) apresentaram média de MN semelhantes de seis e oito por 1.000 células, respectivamente. O MTA F apresentou maior formação de MN quando comparado ao outro grupo controle, bem como ao MTA C, porém, estatisticamente não apresentou diferença do grupo controle. A quantidade média de micronúcleos para o MTA F foi de onze em 1.000 células (Figura 11).

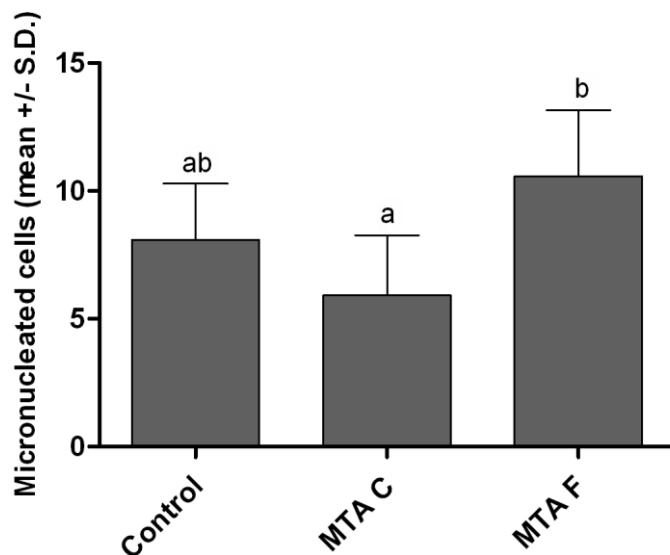


Figura 11. Média de MN encontrados por grupo em 1.000 células e comparação entre os grupos. Letras diferentes, grupos estatisticamente diferentes.

5.3 Resistência à tração diametral (DTS)

Os resultados da DTS dos dois cimentos testados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$). O MTA C apresentou valor superior de 7.6 MPa e o MTA F de 4.8 MPa (Figura 12).

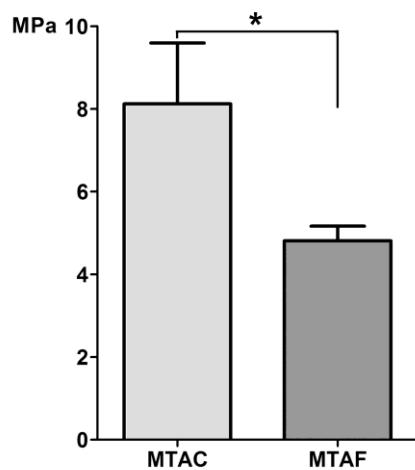


Figura 12. Resistência a tração diametral comparada entre os grupos.

A imagem abaixo mostra o padrão de fratura dos corpos-de-prova (Figura 13).

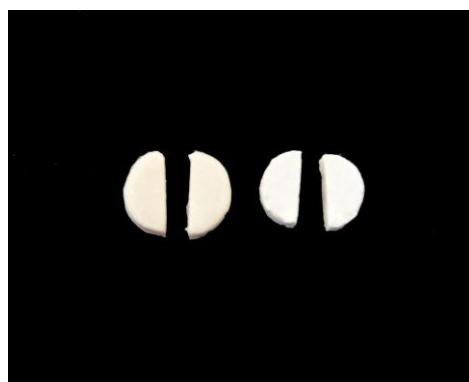


Figura 13. Padrão de fratura apresentado. Foi semelhante nos dois grupos, apresentando fratura em apenas duas partes. MTA F e MTA C, respectivamente.

5.4 Sorção e Solubilidade

A tabela 2 mostra os valores obtidos de sorção e solubilidade para os materiais testados com seu desvio padrão.

O MTA C e o MTA F apresentaram comportamento estatisticamente semelhante em relação à absorção de água ($p = 0,04559$) e estatisticamente diferente em relação a solubilidade na qual, o MTA C apresentou maior valor ($p=0.0002$).

| | Sorção de água (WS) | Solubilidade (SL) |
|-------|--------------------------------|------------------------------|
| MTA C | 11.3 ± 3.0^a | 5.8 ± 1.8^a |
| MTA F | 12.2 ± 0.5^a | 2.9 ± 0.2^b |

Tabela 2. Média e desvio padrão de sorção e solubilidade para o MTA C e para o MTA F. Análise realizada por coluna. Diferentes letras subscritas indicam diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$).

6 DISCUSSÃO

O MTA é um material recomendado para capeamento pulpar direto, pois é um material bioativo, biocompatível que conduz e induz a formação de tecido mineralizado (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010a).

A produção de um MTA fotoativável com presa dual (como proposto no presente estudo) pretende reduzir os problemas relacionados à dificuldade de manipulação do MTA convencional, que são amplamente relacionados na literatura. As propriedades físicas do MTA podem ser influenciadas por diversos fatores, dentre os quais podemos citar a proporção pó/líquido, o método de manipulação, pressão de condensação e o tempo de manipulação (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010a). Além disso, a incorporação de uma maior quantidade de água no momento da manipulação leva ao aumento da porosidade e, consequentemente, ao aumento da solubilidade do cimento, o que pode desencadear uma maior liberação de cálcio. Entretanto, o aumento da quantidade de cálcio liberada deve ser controlado, pois a maior disponibilidade deste elemento diminui a proliferação celular em cultivo (MIDY et al., 2001)

O MTA F, proposto no presente estudo, é composto por duas pastas em seringas distintas que são dispensadas e homogeneizadas em quantidades iguais, diminuindo assim a probabilidade de erros na proporção das duas pastas, o que poderia provocar diminuição das propriedades mecânicas, físicas e biológicas. A proposta de um produto que seja conduzido à cavidade através de seringas, fotoativado por 40s e com a possibilidade de realização de uma restauração definitiva imediata resolveria grande parte dos problemas ainda existentes no MTA.

A metodologia escolhida no presente estudo buscou avaliar a resposta biológica do cimento experimental proposto através do cultivo de fibroblastos pulparestes humanos e células de uma linhagem celular amplamente utilizadas para esse fim. Trabalhos prévios, avaliando a citotoxicidade de materiais odontológicos usam linhagens celulares imortalizadas, como os fibroblastos 3T3 ou L949, que são

células mais resistentes que as células humanas, porém apresentam um metabolismo diferente do fibroblasto pulpar humano frente ao material testado. Sendo assim, com o cultivo primário de fibroblastos pulpare humanos buscou-se sensibilidade específica do teste mais próximos da realidade clínica, visto que a célula pulpar é o objetivo do material que está sendo desenvolvido (CHANG et al., 2010).

Um dos problemas associados com às linhagens celulares, pode ser relacionado ao rearranjo extenso do material cromossômico, no qual alguns dos principais genes envolvidos na viabilidade celular sofrem alterações (DA SILVA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). Para facilitar a reproduzibilidade do experimento e comparação dos resultados optou-se pela utilização dos fibroblastos 3T3/NIH, visto que, a utilização de uma linhagem celular também é recomendada pela ISO (SEPET et al., 2009). Além disso as células 3T3 são amplamente utilizadas para os experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade (SEPET et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2010; NOCCA et al., 2010; ZEFERINO et al., 2010).

Muitos autores têm realizado seus experimentos com a utilização de culturas primárias (PEREZ et al., 2003; BRAZ et al., 2006; TAKITA et al., 2006; YASUDA et al., 2008; CHANG et al., 2010; TRUBIANI et al., 2010; YAN et al., 2010; DAMAS et al., 2011). A vantagem desse tipo de cultivo celular é que possui características muito similares às células dos doadores, e por isso a resposta obtida *in vitro* simula de forma mais fiel o que aconteceria *in vivo*. Como desvantagem pode-se citar a dificuldade de reproduzibilidade, já que as células perpetuam as características do doador, e assim cada cultivo primário terá fenótipo e genótipo similares aos dos seus doadores (FRESHNEY, 2000).

Pérez em 2003 comparou o comportamento de duas linhagens celulares, uma imortalizada (MG-63) e outra de cultivo primário (osteoclastos de feto de ratos) frente ao ProRoot e o MTA branco. A MG-63 teve crescimento e adesão celular mais rápido que os osteoclastos no MTA, porém quanto ao ProRoot não houve diferença.

O processo de adesão celular é complexo e dinâmico, o que representa um papel crítico de cicatrização, crescimento, proliferação e diferenciação celular. A maioria das células de cultura primária adere-se a matriz protéica para sobreviver e proliferar e quando essas células são cultivadas em condições que dificultam a

proliferação e a adesão, elas param de crescer e perdem a viabilidade. Estas características são bem diferentes nas linhagens estabelecidas, as quais apresentam ancoragem independente à semelhança de um tumor *in vivo*, crescimento e metástase (PEREZ et al., 2003).

Pérez, 2003 demonstrou que osteoblastos de cultivo primário mostraram formação de nódulos ósseos enquanto a linhagem celular MG-63 não formou, sendo os osteoblastos mais sensíveis que a MG-63. Desta forma, comprovou que células de culturas primárias apresentam um melhor comportamento para testar os materiais endodônticos.

O ensaio com MTT é considerado o método padrão para determinar a citotoxicidade de materiais dentários em culturas celulares (JAFARNIA et al., 2009; ALANEZI et al., 2010), além de ser um método simples, rápido e preciso (GOMES-FILHO et al., 2009) que apresenta reproduzibilidade, capacidade de testar materiais frescos e fixados em diversas fases.

Uma forma de disponibilizar o material para a execução da reação é o eludato, que se obtém de através da solubilização das substâncias tóxicas do material que potencialmente inibem a atividade e o crescimento celular (DARMANI et al., 2007; ALANEZI et al., 2010; GANDOLFI et al., 2011).

Em nosso estudo foi possível observar que o MTA F obteve resposta semelhante ao MTA C, ou seja, os monômeros utilizados na composição do material experimental não interferiram inicialmente na citotoxicidade do material quando o experimento foi realizado nos FPH. Na análise da figura 9 pode-se observar que o MTA F promoveu maior proliferação celular que o MTA C e apresentou estatisticamente maior viabilidade celular que o grupo sem tratamento (controle). Contudo, quando o mesmo teste foi realizado com os fibroblastos 3T3/NIH, todos os grupos apresentaram comportamento estatisticamente semelhante, no qual o MTA C apresentou viabilidade celular semelhante ao grupo controle, como verificado por Sepet, 2009 bem como o MTA F. Gomes-Filho, 2008, 2010 e 2011, utilizou um MTA fotoativável semelhante ao testado neste estudo, avaliado através da técnica de biocompatibilidade subcutânea *in vivo*, no qual o material experimental demonstrou-se biocompatível, semelhante ao MTA convencional.

O monômero resinoso utilizado no material experimental (MTA F) foi o Bis-EMA. Sabe-se que a maioria dos metacrilatos são altamente citotóxicos (GEURTSEN et al., 1998). Entretanto o Bis-EMA apresentou comportamento menos citotóxico em FPH e 3T3 no estudo de Geurtsen em 2008, no qual o Bis-GMA foi um dos monômeros mais citotóxicos. Em contra partida, o Bis- GMA foi o monômero utilizado no experimento de Gomes-Filho, 2008, e não demonstrou citotoxicidade.

No estudo de Darmani, 2007, a resina Synergy que apresenta Bis-EMA em sua composição apresentou melhor compatibilidade que as outras resinas testadas quando em contato direto com os fibroblastos 3T3, além de maior efeito citotóxico quando em eludato de etanol, justificando os resultados pela alta liberação deste monômero no eludato. A resina P60 que também apresenta Bis-EMA em sua fórmula teve comportamento intermediário. Esses resultados podem ser relacionados a interação dos vários componentes de cada material liberados no meio. Em outro estudo foi observado que o monômero mais liberado das resinas foi o TEGDMA e o menos liberado foi o Bis-GMA (DARMANI et al., 2007).

Zanchi et. al., 2010, propôs um adesivo livre de HEMA substituindo-o pelo monômero Bis-EMA, visto que este poderá apresentar menor efeito citotóxico do adesivo pela diminuição da penetração do adesivo nos túbulos dentinários, uma vez que a difusão das substâncias liberadas dos materiais dentários podem reagir com o tecido pulpar após a difusão através da dentina, principalmente em cavidades profundas (KRIFKA et al., 2011).

Sabe-se que o efeito citotóxico dos monômeros nas células está relacionado ao potencial de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que vai ao encontro da biocompatibilidade do MTA, visto que este material não produz aumento de ROS nas células (CAMARGO et al., 2009). Em concordância, estudos recentes tem comprovado a citotoxicidade dos monômeros amplamente utilizados na composição de adesivos dentários e resinas compostas, como o TEGDMA, o HEMA e o Bis-GMA, através da produção de ROS (CHANG et al., 2010; NOCCA et al., 2010; KRIFKA et al., 2011). Devidos estes fatores o teste de citotoxicidade realizado torna-se necessário uma vez que os monômeros utilizados na composição do MTA F podem causar inflamação pulpar (GEURTSEN et al., 1998).

Poucos estudos testam o Bis-EMA isoladamente, aparecendo em trabalhos na formulação de algum material odontológico. Krifka, 2011, avaliou a citotoxicidade de materiais livres de TEGDMA e HEMA, no qual dois materiais testados apresentavam Bis-EMA em sua fórmula, entretanto tais materiais apresentaram citotoxicidade pela formação de ROS.

Portanto, torna-se difícil comparar nossos resultados de citotoxicidade do MTA experimental com os de outros estudos, porque estes testam materiais com Bis-EMA que apresentam outros componentes associados, podendo a citotoxicidade de determinado material ser relacionada a associação química dos demais componentes (SIDERIDOU e ACHILIAS, 2005; DARMANI et al., 2007; SEISS et al., 2009).

Em nosso experimento utilizamos matriz de poliéster sobre o CP antes da polimerização, este recurso pode diminuir o efeito citotóxico do material, uma vez que diminui a interferência na polimerização da superfície da resina pela presença dos radicais livres de oxigênio (KRIFKA et al., 2011), o oxigênio livre interfere na polimerização completa das resinas, ficando monômeros livres, que podem se difundir pela cavidade bucal ou pela dentina (SEISS et al., 2009).

O teste de genotoxicidade utilizado foi o ensaio pela detecção de micronúcleos (MN), o qual é considerado um indicador de danos cito-genéticos em células humanas (COUNTRYMAN e HEDDLE, 1976).

O principal mecanismo responsável pela indução de micronúcleos é a quebra da fita dupla de DNA, durante a divisão celular, levando à formação de pequenos núcleos, bem menores que o original com fragmentos acêntricos e falha dos aparatos mitóticos, resultando em MN com fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros em seu interior. O MN é resultado de um fragmento ou perda cromossômica durante a mitose ou meiose celular (EVANS, 1997; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003).

O experimento de genotoxicidade foi realizado somente com a linhagem de fibroblastos 3T3/NIH. A técnica de genotoxicidade com os FPH apresentou-se bastante crítica, com dificuldades de adesão e de crescimento celular sobre a lamínula no interior do poço de cultivo para realização do experimento, além de

problemas de fixação e coloração. Estes problemas sugerimos, relacionar-se ao cultivo primário, visto que, para o ensaio de MN existem relatos de linhagens celulares imortalizadas ou utilização de linfócitos humanos ou ainda células humanas pela técnica de citologia esfoliativa (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; BRAZ et al., 2006; DA SILVA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006; FENECH et al., 2011).

Em nosso estudo o MTA C não apresentou efeito genotóxico, apresentando baixa formação de MN em 1.000 células, sendo o número de MN obtidos inferior aos encontrados no grupo controle, de 6MN e 8 MN, respectivamente, o que corrobora com os relatos da literatura. Portanto o MTA não apresenta genotoxicidade (BRAZ et al., 2006; DA SILVA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006; CAMARGO et al., 2009; ZEFERINO et al., 2010). O MTA F apresentou a formação de 11 MN em 1.000 células, o que representa um aumento em relação aos outros grupos, porém não apresentou diferença estatística do grupo controle, porém foi estatisticamente mais genotóxico que o MTA C.

Fernandez *et. al.*, 2010, realizaram ensaio de genotoxicidade com o mesmo grupo controle utilizado neste estudo, em condições metodológicas semelhantes, com a utilização de fibroblastos 3T3/NIH e obtiveram em média 7 MN a cada 1.000 células. Os demais grupos compostos por agentes clareadores, sendo o material mais genotóxico o peróxido de hidrogênio, que é um material comercialmente disponível amplamente utilizado na clínica odontológica, apresentando uma média de 22,3 MN em 1.000 células.

Camargo et al., 2009, realizaram o ensaio de genotoxicidade pela técnica de MN, encontrando valores em torno de 10MN para o MTA C e para o seu grupo controle, somente com meio de cultura, 11,25 MN, o que os torna semelhantes, ou seja, não genotóxico. Utilizaram a linhagem celular V79, o que pode ser a causa da diferença no número de MN, pela diferença de metabolismo celular.

Visto que, o MTA não apresenta efeito genotóxico, a maior formação de MN no grupo do MTA F pode ser justificada pela presença de outro componente do material como o monômero Bis-EMA, que pode apresentar efeito genotóxico, ou pela associação dos componentes do material.

Alguns estudos têm demonstrado que alguns monômeros como o TEGDMA e o HEMA, provocam estresse oxidativo na célula-alvo, produzindo mutagenicidade e apoptose celular, estando à quantidade de MN formada relacionada à concentração do monômero (LEE et al., 2006; SCHWEIKL et al., 2007). Contudo, nenhum estudo de genotoxicidade foi realizado com o Bis-EMA, portanto, mais testes de potencial mutagênico serão necessários.

Se o dano ao DNA causado pelo produto químico carcinogênico é reparado ou persiste é um fato importante para o destino da células-alvo. No entanto, o desenvolvimento de tumores nestas células não é dependente somente dos danos iniciais induzidos no DNA e de sua reparação, mas também de outros fatores, como a produção de metabólitos reativos, a sua distribuição, e seus efeitos sobre a proliferação celular. Neste contexto, os testes de genotoxicidade nem sempre refletem a carcinogenicidade (FENECH, 2000; SASAKI et al., 2002).

Com base nos resultados encontrados nos FPHs e nos fibroblastos 3T3, podemos sugerir diferenças metabólicas entre as linhagens celulares, visto que os produtos testados, as condições experimentais e laboratoriais foram as mesmas, tendo como diferença apenas o tipo celular plaqueado, uma vez que a concentração tóxica de determinado monômero pode variar de acordo com o tipo celular e sua capacidade de desintoxicação (GEURTSEN et al., 1998; NOCCA et al., 2010; DAMAS et al., 2011).

Os testes físicos-mecânicos realizados neste estudo foram necessários para que avaliassemos o comportamento físico de solubilidade e absorção de água, visto que o material estará em contato com a polpa dentária, na presença de umidade, bem como sua resistência mecânica, para que seja determinada a espessura de material que pode ser aplicada na cavidade dentária.

O ensaio de resistência a tração diametral nos indica a resistência mecânica vertical do material, *in vitro*, frente à aplicação de uma carga compressiva. Consiste em um teste mecânico de fácil reproduzibilidade e alta confiabilidade (ANUSAVICE, 2005).

Neste estudo o valor encontrado de DTS para o MTA F foi显著mente menor que o MTA C. Porém a maioria dos autores relatam em seus trabalhos o valor

médio de DTS para o MTA de 4.4 MPa (HUANG et al., 2008; KAO et al., 2009; SHIE et al., 2009), o que se assemelha com o valor encontrado no nosso grupo experimental (MTA F:4.8 MPa). Assim, pode-se afirmar que com relação à propriedade mecânica de resistência à tração diametral o MTA F pode ser aplicado como agente capeador pulpar.

Chiang e Ding, 2010, também relataram valores de DTS ao redor de 7MPa para o MTA convencional como o encontrado nesta pesquisa.

Ogliari et. al., 2008, relataram que os monômeros Bis-EMA 10 e 30 apresentam grande flexibilidade devido à extensão de sua cadeia, o que inviabilizou a realização do teste mecânico de resistência a flexão, na sua forma isolada. No entanto a presença da longa cadeia flexível formada por oxietilenos dos monômeros Bis-EMA 10 e 30 permite que o grau de polimerização dessas cadeias chegue a 100%. A presença de um maior número de unidades de óxido de etileno pode agir como um solvente aprótico e levar a diminuição da concentração de espécies reativas de oxigênio. Estas características dos monômeros utilizados no material experimental (MTA F) podem justificar a viabilidade celular positiva observada no ensaio de citotoxicidade e o baixo valor de resistência a tração diametral.

O MTA apresenta baixa solubilidade (TORABINEJAD et al., 1995), porém essa solubilidade pode aumentar com o tempo do ensaio e pode ser influenciada pelo aumento da razão pó/líquido do material. O óxido de bismuto presente no material é responsável pela diminuição da solubilidade, além de conferir radiopacidade ao material (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010a). A perda de peso do MTA após sete dias ocorre pela liberação de cálcio e o aumento de peso visto após 30 dias de estocagem em solução fisiológica pode ser justificado pela deposição de cristais de apatita sobre a superfície do material (SHIE et al., 2009).

A solubilidade dos grupos foi diferente, onde o MTA F apresentou menos solubilidade que o MTA C. Como no estudo de Gandolfi, et. al., 2011, seu MTA fotoativável composto por HEMA e TEGDMA também apresentou menos solubilidade que os grupos comparados.

Esse resultado pode ser atribuído a característica dos dimetacrilatos de insolubilidade devido à formação das ligações cruzadas, que dificultam a

solubilidade (ANUSAVICE, 2005). No estudo de Ogliari et. al., o Bis-EMA 30, apresentou alta solubilidade, porém o Bis-EMA 10 apresentou solubilidade显著mente menor, o que pode ter gerado um equilíbrio no material experimental e o tornado menos solúvel que o outro grupo formado somente por MTA e água destilada.

A absorção de água apresentada pelos dois grupos testados foi semelhante, portanto as características de expansão e comportamento em ambiente úmido não alteraram as propriedades do material experimental.

Os monômeros dimetacrilatos apresentam a característica de absorver algum líquido. O número de ligações cruzadas forma uma rede tridimensional que diminui a sorção (ANUSAVICE, 2005). A sorção do Bis-EMA 30 é maior que o Bis-EMA 10 e que o MTA (OGLIARI et al., 2008), porém quando se manipula o material se obtém, no CP, ou no caso do capeamento, 20% Bis – EMA 10, 20% Bis – EMA 30, totalizando 40% de composição resinosa, 30% de MTA, além dos outros componentes do material, portanto a maior porcentagem do material não apresenta a característica de alta sorção de água.

O Bis-EMA é um dimetacrilato aromático como o Bis-GMA, que apresenta ligações éter em sua estrutura molecular, mas não apresenta grupos hidroxilas que formam um veículo forte de ligação com a molécula de água, o que pode levar a diminuição da sorção de água deste monômero (MORAES et al., 2010).

Além disto, o teste de sorção e solubilidade foi realizado como preconizado pela ISO4049, de imersão em água por sete dias, que pode ser um tempo curto para a liberação completa dos produtos do material composto pelos monômeros no ambiente. Portanto avaliações neste tempo podem ser consideradas (MORAES et al., 2010). Contudo, altos valores de absorção de água não são desejáveis, pois pode afetar a estabilidades dos compostos resinosos e favorecer a degradação da interface dente restauração (MALACARNE et al., 2006).

7 CONCLUSÕES

Apesar das limitações de um estudo *in vitro*, podemos concluir que:

MTA convencional é um material biocompatível, que não interfere na viabilidade celular, podendo estimular a proliferação celular, portanto não é um material citotóxico e não apresenta potencial genotóxico pela formação de micronúcleos.

O MTA experimental fotoativável dual (MTA F) pode ser considerado biocompatível com as células pulpares humanas, capaz de estimular a proliferação celular neste tipo celular como o MTA convencional (MTA C).

Com a linhagem celular de fibroblastos 3T3/NIH o MTA F mostrou-se biocompatível, mas não promoveu proliferação celular.

O MTA F apresentou maior genotoxicidade em comparação ao MTA C, menor resistência a tração diametral e menor solubilidade. A sorção de água de ambos foi semelhante.

Com base nos dados obtidos neste estudo, *in vitro*, o MTA experimental fotoativável dual apresenta-se como uma alternativa promissora para a realização de capeamento pulpar. Contudo, outros testes precisam ser realizados para avaliação de outras propriedades do material experimental antes de sua utilização *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ACCORINTE MDE, L.; HOLLAND, R.; REIS, A.; BORTOLUZZI, M. C.; MURATA, S. S.; DEZAN, E., JR.; SOUZA, V.; ALESSANDRO, L. D. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. **Journal of Endodontics**, v.34, n.1, p.1-6, 2008.
- 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 Endodontics Journal**, v.36, n.3, p.225-31, 2003.
- ALANEZI, A. Z.; JIANG, J.; SAFAVI, K. E.; SPANGBERG, L. S.; ZHU, Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.109, n.3, p.e122-5, 2010.
- ANUSAVICE, Kenneth. **Phillips Materiais Dentários**. Rio de Janeiro: Elsevier 2005. 764 p.
- BER, B. S.; HATTON, J. F.; STEWART, G. P. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. **Journal of Endodontics**, v.33, n.10, p.1231-4, 2007.
- BORTOLUZZI, E. A.; BROON, N. J.; BRAMANTE, C. M.; FELIPPE, W. T.; TANOMARU FILHO, M.; ESBERARD, R. M. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. **Journal of Endodontics**, v.35, n.4, p.550-4, 2009.
- BORTOLUZZI, E. A.; BROON, N. J.; BRAMANTE, C. M.; GARCIA, R. B.; DE MORAES, I. G.; BERNARDINELI, N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. **Journal of Endodontics**, v.32, n.9, p.897-900, 2006.
- BRAZ, M. G.; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, M. E.; RIBEIRO, D. A. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.33, n.3, p.234-9, 2006.
- CAMARGO, S. E.; CAMARGO, C. H.; HILLER, K. A.; RODE, S. M.; SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. **International Endodontics Journal**, v.42, n.3, p.227-37, 2009.
- CAMILLERI, Josette. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. **International Endodontics Journal**, v.41, n.5, p.408-17, 2008.

CAMILLERI, J.; MONTESIN, F. E.; BRADY, K.; SWEENEY, R.; CURTIS, R. V.; FORD, T. R. The constitution of mineral trioxide aggregate. **Dental Materials**, v.21, n.4, p.297-303, 2005.

CAMILLERI, J.; PITT FORD, T. R. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **International Endodontics Journal**, v.39, n.10, p.747-54, 2006.

CHACKO, V.; KURIKOSE, S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.30, n.3, p.203-9, 2006.

CHANG, M. C.; CHEN, L. I.; CHAN, C. P.; LEE, J. J.; WANG, T. M.; YANG, T. T.; LIN, P. S.; LIN, H. J.; CHANG, H. H.; JENG, J. H. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. **Biomaterials**, v.31, n.32, p.8164-71, 2010.

CHIANG, T. Y.; DING, S. J. Comparative physicochemical and biocompatible properties of radiopaque dicalcium silicate cement and mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.36, n.10, p.1683-7, 2010.

CHNG, H. K.; ISLAM, I.; YAP, A. U.; TONG, Y. W.; KOH, E. T. Properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.31, n.9, p.665-8, 2005.

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, 1976.

COX, C. F.; HAFEZ, A. A.; AKIMOTO, N.; OTSUKI, M.; SUZUKI, S.; TARIM, B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. **American Journal of Dentistry**, v.11 Spec No, p.S55-63, 1998.

COX, C. F.; SUBAY, R. K.; OSTRO, E.; SUZUKI, S.; SUZUKI, S. H. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Operative Dentistry**, v.21, n.1, p.4-11, 1996.

COX, C. F.; TARIM, B.; KOPEL, H.; GUREL, G.; HAFEZ, A. Technique sensitivity: biological factors contributing to clinical success with various restorative materials. **Advances in Dental Research**, v.15, p.85-90, 2001.

D'ANTO, V.; DI CAPRIO, M. P.; AMETRANO, G.; SIMEONE, M.; RENGO, S.; SPAGNUOLO, G. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. **Journal of Endodontics**, v.36, n.11, p.1839-43, 2010.

DA SILVA, G. N.; BRAZ, M. G.; DE CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, D. A. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to regular and white mineral trioxide aggregate. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.102, n.5, p.e50-4, 2006.

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.372-5, 2011.

DAMMASCHKE, T.; STRATMANN, U.; WOLFF, P.; SAGHERI, D.; SCHAFER, E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. **Journal of Endodontics**, v.36, n.5, p.814-9, 2010.

DAMMASCHKE, T.; WOLFF, P.; SAGHERI, D.; STRATMANN, U.; SCHAFER, E. Mineral trioxide aggregate for direct pulp capping: a histologic comparison with calcium hydroxide in rat molars. **Quintessence International**, v.41, n.2, p.e20-30, 2010.

DANESH, G.; DAMMASCHKE, T.; GERTH, H. U.; ZANDBIGLARI, T.; SCHAFER, E. A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. **International Endodontics Journal**, v.39, n.3, p.213-9, 2006.

DARMANI, H.; AL-HIYASAT, A. S.; MILHEM, M. M. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. **Quintessence International**, v.38, n.9, p.789-95, 2007.

DE ALMEIDA, T. M.; LEITAO, R. C.; ANDRADE, J. D.; BECAK, W.; CARRILHO, F. J.; SONOHARA, S. Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.150, n.1, p.16-21, 2004.

DE SOUZA COSTA, C. A.; DUARTE, P. T.; DE SOUZA, P. P.; GIRO, E. M.; HEBLING, J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. **American Journal of Dentistry**, v.21, n.4, p.255-61, 2008.

EVANS, Heather. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. **Mutation Research**, v.392, n.1-2, p.5-10, 1997.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, n.1-2, p.81-95, 2000.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; ZEIGER, E.; CHANG, W. P.; BURGAZ, S.; THOMAS, P.; BOLOGNESI, C.; KNASMUELLER, S.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. **Mutagenesis**, v.26, n.1, p.239-45, 2011.

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 Endodontics Journal**, v.43, n.2, p.102-8, 2010.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of Animal Cells A manual of Basic Technique**. 4^aed. New York: Wiley-Liss. 2000. 578 p.

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

GANDOLFI, M. G.; TADDEI, P.; SIBONI, F.; MODENA, E.; CIAPETTI, G.; PRATI, C. Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical-physical properties, bioactivity and biological behavior. **Dental Materials**, v.27, n.7, p.e134-57, 2011.

GEURTSEN, W.; LEHMANN, F.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.41, n.3, p.474-80, 1998.

GOMES-FILHO, J. E.; DE FARIA, M. D.; BERNABE, P. F.; NERY, M. J.; OTOBONI-FILHO, J. A.; DEZAN-JUNIOR, E.; DE MORAES COSTA, M. M.; CANNON, M. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. **Journal of Endodontics**, v.34, n.1, p.62-5, 2008.

GOMES-FILHO, J. E.; DE MORAES COSTA, M. M.; CINTRA, L. T.; DUARTE, P. C.; TAKAMIYA, A. S.; LODI, C. S.; BERNABE, P. F. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. **Journal of Endodontics**, v.37, n.2, p.250-4, 2011.

GOMES-FILHO, J. E.; DE MORAES COSTA, M. T.; CINTRA, L. T.; LODI, C. S.; DUARTE, P. C.; OKAMOTO, R.; BERNABE, P. F.; NERY, M. J.; CANNON, M. Evaluation of alveolar socket response to Angelus MTA and experimental light-cure MTA. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.110, n.5, p.e93-7, 2010.

GOMES-FILHO, J. E.; WATANABE, S.; GOMES, A. C.; FARIA, M. D.; LODI, C. S.; PENHA OLIVEIRA, S. H. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. **Journal of Endodontics**, v.35, n.11, p.1577-9, 2009.

HORSTED-BINDSLEV, P.; VILKINIS, V.; SIDLAUSKAS, A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.96, n.5, p.591-600, 2003.

HUANG, T. H.; SHIE, M. Y.; KAO, C. T.; DING, S. J. The effect of setting accelerator on properties of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.34, n.5, p.590-3, 2008.

JAFARNIA, B.; JIANG, J.; HE, J.; WANG, Y. H.; SAFAVI, K. E.; ZHU, Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.107, n.5, p.739-44, 2009.

JONTELL, M.; OKIJI, T.; DAHLGREN, U.; BERGENHOLTZ, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.9, n.2, p.179-200, 1998.

KAO, C. T.; SHIE, M. Y.; HUANG, T. H.; DING, S. J. Properties of an accelerated mineral trioxide aggregate-like root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.35, n.2, p.239-42, 2009.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 372 p.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNDI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M., JR.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v.540, n.2, p.153-63, 2003.

KOGAN, P.; HE, J.; GLICKMAN, G. N.; WATANABE, I. The effects of various additives on setting properties of MTA. **Journal of Endodontics**, v.32, n.6, p.569-72, 2006.

KRIFKA, S.; SEIDENADER, C.; HILLER, K. A.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. **Clinical Oral Investigations**, 2011.

LEE, D. H.; LIM, B. S.; LEE, Y. K.; AHN, S. J.; YANG, H. C. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. **Dental Materials**, v.22, n.12, p.1086-92, 2006.

MALACARNE, J.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; SVIZERO, N.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C. K.; CARRILHO, M. R. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. **Dental Materials**, v.22, n.10, p.973-80, 2006.

MAROTO, M.; BARBERIA, E.; VERA, V.; GARCIA-GODOY, F. Mineral trioxide aggregate as pulp dressing agent in pulpotomy treatment of primary molars: 42-month clinical study. **American Journal of Dentistry**, v.20, n.5, p.283-6, 2007.

MATHIEU, S.; EL-BATTARI, A.; DEJOU, J.; ABOUT, I. Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. **Archives of Oral Biology**, v.50, n.2, p.109-13, 2005.

MATT, G. D.; THORPE, J. R.; STROTHER, J. M.; MCCLANAHAN, S. B. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. **Journal of Endodontics**, v.30, n.12, p.876-9, 2004.

MIDY, V.; DARD, M.; HOLLANDE, E. Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.12, n.3, p.259-65, 2001.

MODARESZADEH, M. R.; CHOGLE, S. A.; MICKEL, A. K.; JIN, G.; KOWSAR, H.; SALAMAT, N.; SHAIKH, S.; QUTBUDIN, S. Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. **International Endodontics Journal**, 2010.

MOGHADDAME-JAFARI, S.; MANTELLINI, M. G.; BOTERO, T. M.; MCDONALD, N. J.; NOR, J. E. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. **Journal of Endodontics**, v.31, n.5, p.387-91, 2005.

MORAES, R. R.; SINHORETI, M. A.; CORRER-SOBRINHO, L.; OGLIARI, F. A.; PIVA, E.; PETZHOLD, C. L. Preparation and evaluation of dental resin luting agents with increasing content of bisphenol-A ethoxylated dimethacrylate. **Journal of Biomaterials Applications**, v.24, n.5, p.453-73, 2010.

NOCCA, G.; D'ANTO, V.; DESIDERIO, C.; ROSSETTI, D. V.; VALLETTA, R.; BAQUALA, A. M.; SCHWEIKL, H.; LUPI, A.; RENGO, S.; SPAGNUOLO, G. N-acetyl cysteine directed detoxification of 2-hydroxyethyl methacrylate by adduct formation. **Biomaterials**, v.31, n.9, p.2508-16, 2010.

OGLIARI, F. A.; ELY, C.; ZANCHI, C. H.; FORTES, C. B.; SAMUEL, S. M.; DEMARCO, F. F.; PETZHOLD, C. L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, v.24, n.2, p.165-71, 2008.

PARANJPE, A.; ZHANG, H.; JOHNSON, J. D. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. **Journal of Endodontics**, v.36, n.6, p.1042-7, 2010.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v.36, n.1, p.16-27, 2010a.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. **Journal of Endodontics**, v.36, n.3, p.400-13, 2010b.

PAROLIA, A.; KUNDABALA, M.; RAO, N. N.; ACHARYA, S. R.; AGRAWAL, P.; MOHAN, M.; THOMAS, M. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. **Australian Dental Journal**, v.55, n.1, p.59-64, 2010.

PEREZ, A. L.; SPEARS, R.; GUTMANN, J. L.; OPPERMAN, L. A. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. **International Endodontics Journal**, v.36, n.8, p.564-70, 2003.

PORTER, M. L.; BERTO, A.; PRIMUS, C. M.; WATANABE, I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v.36, n.3, p.524-8, 2010.

RIBEIRO, D. A.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. **Journal of Endodontics**, v.30, n.8, p.593-6, 2004.

RIBEIRO, D. A.; MATSUMOTO, M. A.; DUARTE, M. A.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M. Ex vivo biocompatibility tests of regular and white forms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontics Journal**, v.39, n.1, p.26-30, 2006.

ROBERTS, H. W.; TOTH, J. M.; BERZINS, D. W.; CHARLTON, D. G. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. **Dental Materials**, v.24, n.2, p.149-64, 2008.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, v.519, n.1-2, p.103-19, 2002.

SCHWEIKL, H.; HARTMANN, A.; HILLER, K. A.; SPAGNUOLO, G.; BOLAY, C.; BROCKHOFF, G.; SCHMALZ, G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. **Dental Materials**, v.23, n.6, p.688-95, 2007.

SEISS, M.; LANGER, C.; HICKEL, R.; REICHL, F. X. Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. **Archives of Toxicology**, v.83, n.12, p.1109-15, 2009.

SEPET, E.; PINAR, A.; ILHAN, B.; ULUKAPI, I.; BILIR, A.; TUNA, S. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. **Quintessence International**, v.40, n.8, p.e55-61, 2009.

SHIE, M. Y.; HUANG, T. H.; KAO, C. T.; HUANG, C. H.; DING, S. J. The effect of a physiologic solution pH on properties of white mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.35, n.1, p.98-101, 2009.

SIDERIDOU, I. D.; ACHILIAS, D. S. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. **Journal of Biomedical Materials Research B Appl Biomater**, v.74, n.1, p.617-26, 2005.

SMITH, Anthony. Pulpal responses to caries and dental repair. **Caries Research**, v.36, n.4, p.223-32, 2002.

SMITH, A. J.; CASSIDY, N.; PERRY, H.; BEGUE-KIRN, C.; RUCH, J. V.; LESOT, H. Reactionary dentinogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, v.39, n.1, p.273-80, 1995.

TAKITA, T.; HAYASHI, M.; TAKEICHI, O.; OGISO, B.; SUZUKI, N.; OTSUKA, K.; ITO, K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. **International Endodontics Journal**, v.39, n.5, p.415-22, 2006.

TECLES, 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, 2005.

TEN CATE, R. **Histologia Bucal Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 440 p.

TORABINEJAD, M.; HIGA, R. K.; MCKENDRY, D. J.; PITT FORD, T. R. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. **Journal of Endodontics**, v.20, n.4, p.159-63, 1994.

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, 1995.

TRUBIANI, O.; CAPUTI, S.; DI IORIO, D.; D'AMARIO, M.; PALUDI, M.; GIANCOLA, R.; DI NARDO DI MAIO, F.; DE ANGELIS, F.; D'ARCANGELO, C. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells. **International Endodontics Journal**, v.43, n.8, p.646-53, 2010.

TZIAFAS, D. The future role of a molecular approach to pulp-dentin regeneration. **Caries Research**, v.38, n.3, p.314-20, 2004.

TZIAFAS, D.; BELIBASAKIS, G.; VEIS, A.; PAPADIMITRIOU, S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. **Advances in Dental Research**, v.15, p.96-100, 2001.

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

WATTS, J. D.; HOLT, D. M.; BEESON, T. J.; KIRKPATRICK, T. C.; RUTLEDGE, R. E. Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.33, n.8, p.970-3, 2007.

YAN, P.; YUAN, Z.; JIANG, H.; PENG, B.; BIAN, Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. **International Endodontics Journal**, v.43, n.12, p.1116-21, 2010.

YASUDA, Y.; OGAWA, M.; ARAKAWA, T.; KADOWAKI, T.; SAITO, T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v.34, n.9, p.1057-60, 2008.

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.503-8, 2010.

ZARRABI, M. H.; JAVIDI, M.; JAFARIAN, A. H.; JOUSHAN, B. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. **Journal of Endodontics**, v.36, n.11, p.1778-81, 2010.

ZEFERINO, E. G.; BUENO, C. E.; OYAMA, L. M.; RIBEIRO, D. A. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. **International Endodontics Journal**, v.43, n.10, p.843-8, 2010.

ANEXOS

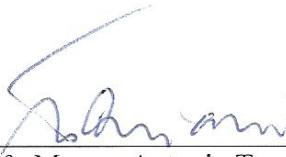


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 15 de julho de 2010.

PARECER Nº 162/2010

O projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE UM CIMENTO EXPERIMENTAL À BASE DE MTA COM O MODELO DE CULTIVO DO ÓRGÃO DENTÁRIO** está constituído de forma adequada, cumprindo, na suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.


Profº. Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPel

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa



**Universidade Federal de Pelotas
Faculdade de Odontologia
Programa de Educação Tutorial
Banco de Dentes Humanos**



TERMO DE DOAÇÃO

Eu, _____, natural de _____, sexo _____, residente à _____, telefone _____, portador do RG _____, aceito doar o(s) dente(s) _____, para o **BANCO DE DENTES HUMANOS DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS - RS**, ciente de que o(s) mesmo(s) será(ão) utilizado(s) pelos alunos desta Faculdade para estudo e treinamento pré-clínico. Estou consciente de que este(s) dente(s) foi(foram) extraído(s) por indicação terapêutica para melhoria de minha saúde, como documento em meu prontuário. Caso este(s) dente(s) seja(m) utilizado(s) em pesquisa, esta deverá ter sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO/UFPel, sendo preservada a minha identidade na divulgação.

Pelotas, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do doador ou responsável

