

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**“Comportamento celular em materiais de restauração em
lesões não cariosas”**

Catarina da Silva Delgado Valente

Orientadores:

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Professora Doutora Mariana Freitas Brito da Cruz

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2022

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**“Comportamento celular em materiais de restauração em
lesões não cariosas”**

Catarina da Silva Delgado Valente

Orientadores:

Professora Doutora Joana Rita Oliveira Faria Marques

Professora Doutora Mariana Freitas Brito da Cruz

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2022

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Joana Marques, orientadora deste trabalho, o meu mais profundo e sincero agradecimento por toda a disponibilidade, paciência, incentivo, conhecimento partilhado durante toda a preparação desta dissertação. Sem o seu apoio e dedicação não teria sido possível.

À Professora Doutora Mariana Freitas Brito da Cruz, coorientadora deste trabalho, o meu mais profundo e sincero agradecimento por toda a disponibilidade, dedicação e conhecimento durante toda a preparação e realização desta dissertação. Sem o seu apoio não teria sido possível.

À Professora Doutora Isabel Vasconcelos por todo o conhecimento partilhado ao longo deste ano, que foi imprescindível para a realização desta dissertação.

À Doutora Joana Cordeiro por todo acompanhamento, disponibilidade, entejuda e conhecimento ao longo dos ensaios, foi sem dúvida um elemento-chave para a realização desta dissertação.

Um muito obrigada a todos os elementos do grupo de investigação (GIBBO) pela forma calorosa como me receberam e me integraram, estando sempre disponíveis para qualquer esclarecimento, e em especial à Dr^a Ana Marques pela amizade, ajuda, disponibilidade e paciência ao longo desta jornada.

À minha família “Medieval” por todos os momentos incríveis que sempre me proporcionaram e por todo o companheirismo e amizade com que me brindaram de norte a sul do país.

Aos meus Pais e familiares por sonharem tanto quanto eu e acreditarem em mim até ao fim. Por me darem asas para voar. Por me motivarem em todos os momentos. A Eles devo-lhes o mundo. Fizeram de mim a mulher que sou hoje.

Ao meu companheiro de todas as horas, João Pedro, por ter acompanhado este meu bonito e desafiante percurso e nunca me ter deixado cair. O meu eterno porto de abrigo. Esteve sempre lá para mim. Ao meu Logan, pelas recepções afetuosas com que me recebeu diariamente e pela companhia infinita. Esteve sempre ao meu lado.

Às minhas estrelinhas Avó Graça e Avô Manuel por me guiarem e iluminarem o meu caminho lá do alto. Este curso é por vocês... o Nosso curso.

A todos um agradecimento sincero

RESUMO

Objetivo: Desenvolvimento e realização de um protocolo para avaliação do comportamento celular de fibroblastos gengivais humanos (HGF-hTERT) em diferentes materiais restauradores de lesões não cariosas (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material, Biodentine™, GC Fuji II LC[®], SDR™ dentsply, Biocal®-CAP).

Materiais e Métodos: Foi desenvolvido e produzido por métodos aditivos ou subtrativos um modelo de suporte para os materiais a testar, tendo sido testada e validada a sua biocompatibilidade numa linha celular de fibroblastos gengivais humanos (HGF-hTERT). Foi avaliado o efeito do material de base e de diferentes métodos de descontaminação e posteriormente selecionada a combinação mais adequada. Os materiais restauradores foram preparados nos suportes padronizados, de acordo com as regras de cada fabricante nos seguintes grupos de estudo: ProRoot® MTA Root Canal Repair Material com presa tomada (MTA set), Biodentine™ com presa tomada (Biodentine set), GC Fuji II LC[®] (Fuji II), SDR™ Dentsply (SDR), Biocal®-CAP (Biocal-CAP), Biodentine™ sem presa tomada (Biodentine fresco), ProRoot® MTA Root Canal Repair Material sem presa tomada (MTA fresco) (n=15 em cada grupo). A viabilidade celular de células HGF-hTERT em contacto direto com os materiais foi avaliada aos 1, 3 e 7 dias utilizando um método à base de resazurina. Os resultados foram apresentados como intensidade de fluorescência sob a forma de média ± desvio padrão. Realizaram-se comparações entre grupos por ANOVA unidirecional e de medidas repetidas (teste post – hoc de Tukey) utilizando um software de estatística. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

Resultados: Ao longo do tempo, os grupos Zr – BU - UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta) e Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta) apresentaram melhores resultados de biocompatibilidade com as células HGF. Dentro dos materiais restauradores, foi o grupo do Biocal-CAP que apresentou resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo, sendo seguido pelo grupo do Fuji II. Observou-se viabilidade celular estatisticamente superior no Biocal-CAP face aos restantes materiais ao longo do tempo ($p < 0,05$).

Conclusões: O Biocal-CAP (Biocal®-CAP), poderá representar um material promissor e aumentar-se a sua área de aplicabilidade, passando a ter também como indicação de utilização as RECI, no entanto, mais estudos que avaliem outras propriedades relevantes serão necessários por forma a comprovar a sua utilização.

Palavras-Chave: “reabsorção externa cervical invasiva”, ”fibroblastos gengivais humanos”, “cimentos de silicato de cálcio“, “resina”, “ionómero de vidro”.

ABSTRACT

Objectives: Development and implementation of a protocol to evaluate the cellular behavior of human gingival fibroblast (HGF-hTERT) in different restorative materials for non-carious lesions (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material, Biodentine™, GC Fuji II LC® , SDR™ dentsply, Biocal®-CAP).

Methods: A support model for the materials to be tested was developed and produced by additive or subtractive methods, and its biocompatibility was tested and validated in a human gingival fibroblast cell line (HGF-hTERT). The effect of the base material and of different decontamination methods was evaluated and the most suitable combination was subsequently selected. The restorative materials were prepared on the standardized supports, according to the rules of each manufacturer in the following study groups: ProRoot® MTA Root Canal Repair Material with fixed setting (MTA set), Biodentine™ with fixed setting (Biodentine set), GC Fuji II LC® (Fuji II), SDR™ Dentsply (SDR), Biocal®-CAP (Biocal-CAP), Biodentine™ without socket (Biodentine fresh), ProRoot® MTA Root Canal Repair Material without socket (MTA fresh) (n= 15 in each group). Cell viability of HGF-hTERT cells in direct contact with the materials was assessed at 1, 3 and 7 days using a resazurin-based method. Results were presented as fluorescence intensity as mean ± standard deviation. Comparisons were performed between groups by one-way ANOVA and repeated measures (Tukey's post hoc test) using statistical software. The significance level was defined as $p < 0,05$.

Results: Over time, the groups Zr – BU - UV (Zirconia - Ultrasonic bath - Ultraviolet) and Acr – BU – UV (Acrylic - Ultrasonic bath - Ultraviolet) showed better biocompatibility results with HGF cells. Among the restorative materials, it was the Biocal-CAP group that showed statistically superior cell viability results compared to all the groups under study, followed by the Fuji II group. Statistically superior cell viability was observed in Biocal-CAP compared to the other materials over time ($p < 0,05$).

Conclusions: Biocal-CAP (Biocal®-CAP) may represent a promising material and increase its area of applicability, starting to also have RECI as an indication of use, however, more studies that evaluate other relevant properties will be necessary for in order to prove its use.

Key words: “invasive external cervical resorption”, “human gingival fibroblast” “
calcium silicate-based cements”

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. REABSORÇÕES EXTERNAS CERVICAIS INVASIVAS	1
1.1. ABORDAGEM TERAPÊUTICA	4
2. MATERIAIS RESTAURADORES DAS RECI	6
OBJETIVOS	10
MATERIAIS E MÉTODOS	11
1. DESENVOLVIMENTO E DESINFECÇÃO DOS DISCOS DE SUPORTE	11
2. PREPARAÇÃO GERAL DOS MATERIAIS RESTAURADORES.....	12
3. CULTURAS CELULARES E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE CELULAR.....	15
3.1 VIABILIDADE CELULAR	16
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
4.1 CÁLCULO DIMENSIONAL DA AMOSTRA E PODER ESTATÍSTICO	17
RESULTADOS	18
1. CULTURAS E COMPORTAMENTO CELULAR – DISCOS DE SUPORTE E PROTOCOLOS DE DESINFECÇÃO	18
1.1 VIABILIDADE.....	18
2. CULTURAS E COMPORTAMENTO CELULAR - MATERIAIS.....	21
2.1. VIABILIDADE.....	21
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 24h de cultura.19
- Gráfico 2** - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 48h de cultura.19
- Gráfico 3** - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 72h de cultura.20
- Gráfico 4** - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 24h, 48h e 72h de cultura.21
- Gráfico 5** - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material), Biodentine set (Biodentine™), Fuji II (GC Fuji II LC®), SDR (SDR™ dentsply), Biocal-CAP (Biocal®-CAP), Biodentine fresco (Biodentine™), MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ao 1º dia de cultura.22
- Gráfico 6** - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material), Biodentine set (Biodentine™), Fuji II (GC Fuji II LC®), SDR (SDR™ dentsply), Biocal-CAP (Biocal®-CAP), Biodentine fresco (Biodentine™), MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ao 3º dia de cultura.22

Gráfico 7 - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material), Biodentine set (Biodentine™), Fuji II (GC Fuji II LC®), SDR (SDR™ dentsply), Biocal-CAP (Biocal®-CAP), Biodentine fresco (Biodentine™), MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ao 7º dia de cultura.23

Figura 1 - Classificação da Reabsorção Cervical Invasiva segundo *Heithersay*

(Fonte: *Heithersay GS Invasive cervical resorption: An analysis of potential predisposing factors. Quintessence Int.1999;30, pag.84*).4

Figura 2 - Desenho esquemático dos discos de suporte.12

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação tridimensional para a Reabsorção cervical externa invasiva (Fonte: Adaptado de <i>Patel et al.2018c</i>).	4
Tabela 2 - Opções de tratamento para Reabsorções cervicais externas invasivas. (Fonte: Adaptado de <i>European Society of Endodontology position statement: External Cervical Resorption, S. Patel et al. 2018</i>).	5
Tabela 3 - Descrição dos grupos integrantes no ensaio dos discos de suporte.	11
Tabela 4 - Materiais incluídos no presente estudo.	12

LISTA DE ABREVIATURAS

H₂O_d - Água destilada

BUS - Banho ultrassónico

CAD - Computer aided design

Cm - Centímetro

CO₂ - Dióxido de carbono

SiO₂ - Dióxido de Sílica

DMEM - Dulbecco's Modified Eagles's Medium

DP - Desvio Padrão

EtOH - Etanol

FMDUL - Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa

°C - Graus Celsius

NaClO - Hipoclorito de sódio

HGF-hTERT - Human Gingival Fibroblast – human telomerase reverse transcriptase

IVMR - Ionómero de vidro modificado com resina

LCNC - Lesões cervicais não cariosas

mg/ml - Miligramas por mililitro

ml - Mililitro

µl - Microlitro

µm - Micrómetro

MTA - Mineral trióxido agregado

nm - Nanómetro

CaO - Óxido de Cálcio

MgO - Óxido de Magnésio

PBS - Tampão fosfato salino

RECI - Reabsorção externa cervical invasiva

STL - Standard Triangle Language

Ca³SiO⁵ - Silicato tricálcico

K²SO⁴ - Sulfato de Potássio

Na²SO⁴ - Sulfato de Sódio

TCFC - Tomografia computadorizada de feixe cónico

UV - Ultravioleta

INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos tem-se vindo a verificar um aumento da prevalência e incidência das patologias dentárias. Uma das patologias a realçar diz respeito à perda de tecido dentário na região vestibular cervical das peças dentárias, sendo-lhe atribuída a nomenclatura de lesões cervicais não cariosas (LCNC). As LCNC caracterizam-se pela perda de estrutura dentária irreversível ao nível da junção amelo-dentinária do dente, sem ação bacteriana.^(1,2) A sua aparência é variável, podendo apresentar-se como uma depressão rasa ou larga em forma de disco ou de cunha.⁽³⁾

Esta perda de tecido dentário pode ser desencadeada por fenómenos de abrasão, erosão ou abfração ou, ainda, ter início ao nível do cimento por fenómenos de reabsorção, sejam eles externos ou internos. No entanto, a sua etiologia ainda não se encontra bem esclarecida.⁽⁴⁾

É reconhecido o potencial para as LCNC se desenvolverem ao longo do tempo, podendo mesmo, nalguns casos afetar a polpa, os tecidos periodontais, bem como causarem hipersensibilidade dentinária e comprometerem a estética, sendo de especial importância uma abordagem terapêutica precoce.⁽⁵⁾

Algumas evidências clínicas demonstraram que a restauração destas lesões deve ser feita, por forma a impedir o seu avanço, melhorando desta forma não só a manutenção da higiene oral do paciente, mas também a diminuição da hipersensibilidade dentinária, a prevenção do envolvimento patológico da polpa, bem como a melhoria da estética dentária.^(6,7,8) De entre este tipo de LCNC são destacadas, neste estudo, as reabsorções externas cervicais invasivas (RECI).

1. Reabsorções externas cervicais invasivas

As reabsorções cervicais externas invasivas (RECI) definem-se como um processo localizado de reabsorção externa da raiz, que geralmente se inicia ao nível da região cervical do dente afetado envolvendo o ligamento periodontal, cimento e dentina.⁽⁹⁾ No entanto, em estadios mais avançados os tecidos pulparem também poderão estar envolvidos.^(10, 11, 12) Este tipo de reabsorções são incomuns, com uma prevalência de 0,02% a 2,3%, mas de extrema

relevância, uma vez que, pode culminar na perda dentária devido à sua natureza agressiva e em simultâneo assintomática.^(11,13,14)

A sua etiologia, ainda não é clara, porém, muito provavelmente consiste num processo de origem multifatorial, na qual a presença de um defeito de desenvolvimento na junção cimento-esmalte torna esta estrutura mais suscetível ao processo de reabsorção.⁽¹⁰⁾ A história prévia de traumatismo dentário e/ou tratamento ortodôntico são também fatores comumente associados a esta patologia, no entanto, carecem de estudos que confirmem a sua relação causa-efeito como fatores etiológicos.⁽¹⁴⁻¹⁷⁾

As RECI têm por base um processo de reabsorção patológico que se inicia na superfície externa do dente, superiormente à crista óssea alveolar e gradualmente vai substituindo a estrutura dentária mineralizada por tecido fibro-vascular granulomatoso ou tecido fibro-ósseo.⁽¹³⁾ O processo de reabsorção é impulsionado por osteoclastos que, inicialmente penetram no dente através de numerosos canais.⁽¹⁸⁾ Estas podem espalhar-se circunferencialmente e/ou numa direção apico-coronal dentro da raiz. O canal radicular é circundado por uma camada protetora, conhecida como lâmina resistente à reabsorção pericanalar.⁽¹⁰⁾ Esta última resiste ao processo de reabsorção, sendo constituída principalmente por pré-dentina e dentina.⁽¹⁹⁾ No entanto, as RECI consistem num processo celular complexo e dinâmico que ainda não se encontra completamente esclarecido.^(10,11,15)

Clinicamente, surge como uma cavitação cervical associada a uma irregularidade no contorno gengival e/ou descoloração rosada ao nível do esmalte subjacente. Normalmente, os dentes afetados são assintomáticos, podendo manifestar sintomas pulpares e/ou periapicais apenas em fases tardias de progressão da doença.^(10,19) Frequentemente, os dentes mais afetados são os incisivos superiores, caninos e primeiros molares mandibulares.⁽¹⁵⁾

As RECI têm como diagnóstico diferenciais possíveis, a reabsorção cervical interna, lesões de cárie cervical ou de colo, lesões não cariosas, tais como, abfração, abrasão e erosão, e ainda, a presença do efeito de *burnout*. Este tipo de lesões são de difícil diagnóstico. Nem sempre os sinais clínicos são claros, sendo a sua deteção efetuada com auxílio radiográfico.^(14,20) A sua distinção é feita através da sua aparência clínica, uma vez que, a base da cavidade de uma RECI é dura e aquando da realização da sondagem periodontal e frequentemente resulta em hemorragia à sondagem.^(20,21) Estas lesões são altamente

vascularizadas envolvendo a região supracoronal do dente, surgindo como manchas rosadas. Outras lesões, como é o caso da reabsorção cervical interna, quando se estende para os tecidos supragengivais, também podem apresentar-se desta forma.

Radiograficamente, não existe uma aparência "clássica" das RECI. A sua aparência é variável e influenciada pelo tamanho e natureza da lesão. Frequentemente, surge como uma lesão radiolúcida (fase de reabsorção), irregular e assimétrica, permitindo identificar o canal radicular que se encontra bem delineado. Na fase de reparação da lesão, consequência da deposição de tecido calcificado, é possível observar uma aparência mosqueada e mais radiopaca.^(10,22) No entanto, dependendo do estadio da lesão, poderá surgir uma combinação das duas. Para diferenciar as RECI da reabsorção cervical interna, o contorno das paredes do canal radicular deve ser observado em detalhe aquando da análise radiográfica (radiografias periapicais). A técnica paralaxe pode ser utilizada para realizar esta distinção entre ambas, bem como para confirmar a localização de lesões de RECI que não são detetadas clinicamente por sondagem. No entanto, as limitações das radiografias periapicais encontram-se bem documentadas na literatura, podendo resultar em diagnósticos incorretos.^(18,23-26)

Heirthersay desenvolveu uma classificação clínica para as RECI. Esta classificação é baseada em imagens bidimensionais.⁽²⁵⁾ As RECI foram classificadas em quatro classes distintas, divididas em zonas menos invasivas até zonas de maior reabsorção que se estendem além do terço coronal do canal radicular. De acordo com a classificação de *Heirthersay*, no tratamento das lesões classes I e II, o índice de sucesso ronda os 100%, nas lesões classe III o índice de sucesso é cerca de 77,8% e nas lesões classe IV o índice de sucesso é de 12,5%. Contudo, esta classificação resulta na subestimação e/ou avaliação inadequada da verdadeira extensão do processo de reabsorção.⁽²⁵⁾

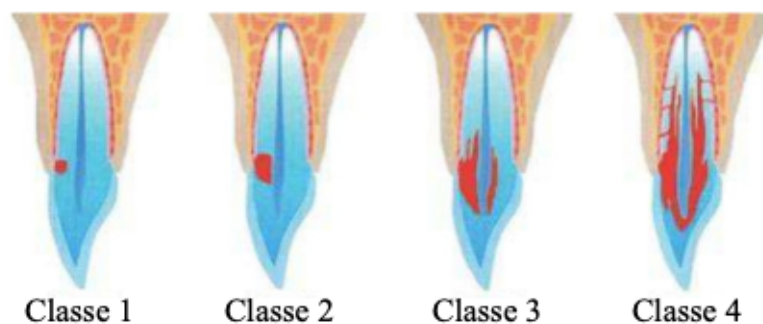


Figura 1 – Classificação da Reabsorção Cervical Invasiva segundo Heithersay
 (Fonte: Heithersay GS Invasive cervical resorption: An analysis of potential predisposing factors. Quintessence Int.1999;30, pag.84).

Patel desenvolveu uma classificação tridimensional que tem por base radiografias periapicais e tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC).⁽²⁷⁾ O objetivo desta classificação descritiva, consiste em garantir um diagnóstico preciso e auxiliar na comunicação entre médicos dentistas.

Tabela 1 – Classificação tridimensional para a Reabsorção cervical externa invasiva.
 (Fonte: Adaptado de Patel et al. 2018c).

Altura	Distribuição Circunferencial	Proximidade a canal radicular
1.Ao nível da junção cimento-esmalte (supracrestal)	A: $\leq 90^\circ$	d: lesão confinada à dentina
2.Estende-se para o terço coronal da raiz (subcrestal)	B: $>90^\circ$ até $\leq 180^\circ$	p: provável envolvimento pulpar
3.Estende-se até ao terço médio da raiz.	C: $>180^\circ$ até $\leq 270^\circ$	
4.Estende-se até ao terço apical da raiz.	D: $>270^\circ$	

1.1. Abordagem terapêutica

O tratamento das RECI visa inativar o processo de reabsorção por meio da remoção do tecido reabsorvido e do suprimento sanguíneo para os osteoclastos existentes. Os defeitos, consequência do processo de reabsorção, devem ser completamente desbridados e adequadamente selados para evitar a revascularização e posterior ação osteoclástica.⁽²⁸⁾ Por conseguinte, o manuseamento eficaz depende de uma boa visualização e acessibilidade à lesão.^(18,24) As opções de tratamento para as RECI dependem da extensão, natureza e

acessibilidade do processo de reabsorção. As diferentes opções de tratamento encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2 – *Opções de tratamento para Reabsorções cervicais externas invasivas.*
(Fonte: Adaptado de *European Society of Endodontology position statement: External Cervical Resorption, S. Patel et al. 2018*).

Tabela 2 Opções de tratamento para RECI

Reparação externa do defeito de reabsorção ±
tratamento endodôntico
Reparação interna e tratamento canal
Reimplante intencional
Revisão periódica (dentes não tratáveis)
Extração (dentes não tratáveis)

No processo de restauração destas lesões, o formato e localização das mesmas podem afetar áreas subgingivais, supracrestais e até subcrestais, tornando o seu tratamento bastante desafiante. Algumas dificuldades encontradas estão relacionadas com o controlo da humidade, uma vez que, as margens cervicais são geralmente colocadas em áreas subgingivais ou próximas das mesmas.⁽²⁹⁾ Estes defeitos devem, por isso, ser restaurados com materiais adequados. Os materiais restauradores encontram-se em contacto direto com os tecidos periodontais circundantes, pelo que, as suas características: desempenho mecânico, manuseamento e, principalmente, a sua citotoxicidade e potenciais efeitos adversos a nível celular, desempenham um papel importante.⁽³⁰⁾

A nível clínico, os materiais ideais devem promover um selamento adequado, ser biocompatíveis e, simultaneamente, devem resistir à exposição a fluidos orais e bactérias. O selamento da porção coronal dos dentes direcionados ao tratamento endodôntico surge como um critério determinante para o sucesso ou insucesso deste. Vários fatores influenciam a obtenção do correto selamento coronário, evitando assim a microinfiltração por microrganismos. Entre estes fatores destacam-se o tratamento pré-endodôntico, a instrumentação e desinfeção correta e eficaz dos canais radiculares, aplicação de materiais de selamento imediato, o número de sessões em que o tratamento é concluído e ainda a restauração provisória e definitiva do tratamento endodôntico.

Até ao momento, não há consenso sobre o material e protocolo ideais para a restauração e selamento de lesões induzidas por processos de RECI.⁽³⁰⁾

2. Materiais restauradores das RECI

Idealmente, material restaurador nas RECI deve apresentar características como: adesão à estrutura dentária, um selamento adequado, insolúvel em fluídos orgânicos, dimensionalmente estável, não reabsorvível, radiopaco e biocompatível.⁽³¹⁾

Desde a sua introdução clínica, que os cimentos hidráulicos foram reconhecidos pela sua variada aplicabilidade, que se deve à sua natureza hidráulica.⁽³²⁾

Estes materiais requerem água para alcançar, a nível físico e mecânico, as suas características ideais. Não se deterioram quando molhados e formam hidróxido de cálcio como subproduto da reação de hidratação.⁽³²⁾ Em ambientes específicos, como é o caso do ambiente existente na cavidade oral, podem ocorrer outras reações com componentes do meio como sangue, fluido tecidual, dentina, osso, soluções irrigantes, materiais restauradores, entre outros. Podem existir alterações na composição química, principalmente, ao nível da superfície, de forma que a sua interação com aquele meio seja alterada. Esta interação ambiental poderá implicar uma mudança na composição química da superfície, levando ao insucesso da adesão e a efeitos deletérios no material.⁽³²⁾

O agregado trióxido mineral (MTA) foi descrito pela primeira vez na literatura científica em 1993 ⁽³³⁾ e recebeu aprovação para aplicação endodôntica pela Food and Drug Administration dos EUA em 1998.⁽³⁴⁾ Devido às suas boas propriedades físicas e biológicas ganhou ampla aceitação desde a sua introdução, sendo muitas vezes, escolhido como padrão para os materiais restauradores a ser investigados.^(35, 36) Era inicialmente utilizado como material de obturação canal, no entanto, tem sido empregue numa variedade de situações clínicas.

O Proroot® MTA é composto por cimento Portland refinado e óxido de bismuto, podendo apresentar em menores quantidades de SiO_2 , CaO , MgO , K_2SO_4 e Na_2SO_4 .⁽³⁷⁻³⁹⁾ O cimento de Portland, principal constituinte, tem por base uma mistura de silicato dicálcico, silicato tricálcico, aluminato tricálcico, gesso e aluminoferrita tetracálcico.⁽³⁷⁻³⁹⁾ Este é um

material hidrofílico, que não só tolera bem a presença de água, como necessita de uma certa humidade para potenciar a sua reação de presa.^(40,41)

Clinicamente, o MTA apresenta um bom desempenho no selamento de perfurações radiculares⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ e resultados favoráveis quando utilizado em restauração de defeitos de reabsorção com acesso cirúrgico.^(45,46) No entanto, o seu longo tempo de presa e o potencial de descoloração podem ser prejudiciais relativamente aos defeitos radiculares cervicais extensos em áreas esteticamente sensíveis.^(30,45,46) As propriedades físicas e o tempo de presa do MTA podem ser afetados por diferentes líquidos de preparação, tendo demonstrado atividade antibacteriana e antifúngica, presumivelmente devido ao seu pH.⁽³¹⁾ Tem-se procurado através da introdução de novos materiais colmatar estas adversidades. Dadas as propriedades mecânicas adversas dos cimentos de silicato de cálcio, os cimentos de ionómero de vidro modificados com resina podem representar uma alternativa promissora, sobretudo, nos grandes defeitos de reabsorção.⁽⁴⁷⁾

Os cimentos de ionómero de vidro modificados com resina (IVMR) foram desenvolvidos para colmatar algumas das adversidades encontradas com os clássicos cimentos de ionómero de vidro, tais como a sensibilidade inicial à humidade e a baixa resistência mecânica que apresentam e, por outro lado, mantendo e melhorando algumas das suas vantagens clínicas. Aos componentes dos clássicos ionómeros de vidro foram adicionados monómeros funcionais de resinas fotopolimerizáveis.⁽⁴⁸⁾ Os cimentos de ionómero de vidro modificados com resina são conhecidos por serem citotóxicos para as células.⁽⁴⁹⁾ Este mesmo efeito citotóxico parece estar associado principalmente à libertação de monómero de metacrilato de hidroxietil não convertido e o seu efeito ao nível da polpa dentária.⁽⁵⁰⁾ Devido ao seu baixo peso molecular e propriedades hidrofílicas, o monómero tem a capacidade de se difundir com relativa facilidade através dos túbulos dentinários para o tecido pulpar, podendo conduzir, posteriormente, a inflamação irreversível.⁽⁵⁰⁾ Segundo o fabricante, o Fuji II LC é um ionómero de vidro modificado com resina com elevada resistência à flexão e adesão dentária, mesmo na presença de saliva. Consequência de estudos durante 5 anos, o Fuji II LC apresentou excelentes taxas de retenção em LCNC.⁽⁵¹⁾

As resinas compostas permitem substituir tecidos dentários perdidos, consequência da RECI e restaurar a integridade da estrutura dentária.⁽²⁹⁾ O SDRTM dentsply consiste num

compósito de resina fluida, utilizado como base, podendo ser aplicado num único incremento com espessura de 4mm, atingindo a polimerização após 20s de exposição a uma intensidade de luz superior a 50 mW/cm². As propriedades das resinas compostas dependem do grau de conversão da matriz da resina. No entanto, durante esta conversão, a libertação de monómeros pode conduzir ao aumento da citotoxicidade deste material. Foi demonstrada uma correlação positiva entre a dureza e o grau de conversão. No entanto, a presença de dentina esclerótica potencia uma menor adesão face à dentina sã e contribui para as elevadas taxas de insucesso das restaurações em resina composta.⁽⁵²⁻⁵³⁾ A baixa taxa de retenção das resinas compostas pode ser também explicada pela flexão contínua que o dente sofre na região cervical durante a mastigação, que contrasta com o elevado módulo de elasticidade deste material restaurador.⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾

Estudos já realizados permitem verificar que as taxas de retenção e descoloração marginal de restaurações de resina composta ao nível da região cervical não são afetadas pela viscosidade do material, embora a resina composta de consistência fluída, como é o caso do SDR™ dentsply, apresentou uma boa adaptação marginal.⁽²⁹⁾ Aquando da aplicação deste material é de extrema importância a presença de um isolamento adequado, pois este permite um controlo efetivo da humidade dos microrganismos, durante todo o procedimento, por forma a prevenir a microinfiltração.⁽⁵⁷⁾

O Biodentine tem sido, frequentemente, reconhecido na literatura como um material promissor, sendo um dos representantes dos cimentos à base de silicato tricálcico (Ca³SiO⁵) utilizados em Medicina Dentária, a par do MTA.⁽⁵⁸⁾ Quanto aos seus aspetos positivos, a literatura tem evidenciado as suas propriedades físicas superiores: melhor manuseamento, maior biocompatibilidade e ampla gama de aplicações clínicas.⁽⁵⁹⁾ Os tempos de presa inicial, descritos em diferentes estudos, variam entre 6 a 30 min, e a sua radiopacidade é significativamente menor quando comparada com outros cimentos à base de silicato tricálcico. Apresenta também boa resistência à compressão e flexão, adequada microdureza e capacidade de selamento, libertação de iões de cálcio em quantidade superior face a outros cimentos à base de silicato tricálcico.⁽⁵⁸⁾ A atividade antimicrobiana é superior face a microrganismos específicos como é o caso de *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida Albicans*, no entanto, é menor contra *Streptococcus mutans* e *Sreptococcus salivarius*. A sua citotoxicidade depende tanto da dose como do tempo.⁽⁵⁸⁾

Este material apresenta-se sob a forma de uma cápsula que contém o pó e uma ampola que contém o líquido. Para fins de mistura, uma dose pré-medida de líquido é derramada na cápsula e em seguida é misturada recorrendo a uma máquina misturadora de amálgama. O pó é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de ferro e óxido de zircónia. O líquido é composto por cloreto de cálcio e um polímero hidrossolúvel.^(59,60)

A Harvard® introduziu recentemente no mercado o Biocal®-CAP que consiste num cimento de MTA modificado com resina, bioativo e fotopolimerizável que tem como principal função proteção pulpar direta e indireta, no tratamento de dentes tanto decíduos como permanentes. A libertação de cálcio e o seu elevado pH (pH 11) promovem a formação de hidroxiapatite e de dentina terciária, tendo a capacidade de criar um ambiente hostil para as bactérias.

Segundo o fabricante, este material apresenta tolerância à humidade, boa radiopacidade, baixa solubilidade, rápida fotopolimerização (20s), o que permite continuar de imediato com o tratamento, e propriedades tixotrópicas.

Até o momento não há consenso sobre o material e protocolo ideal para reparação e selamento de lesões induzidas por processos de RECI. Procurámos, portanto, com este estudo averiguar qual dos materiais atualmente no mercado mais frequentemente utilizados para esta finalidade apresentaria as características mais favoráveis do ponto de vista de resposta e compatibilidade celular, bem como definir protocolos que nos possibilitassem avaliar de forma reprodutível a biocompatibilidade destes materiais.

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar o comportamento celular dos fibroblastos gengivais humanos, enquanto principais células periodontais, ao longo do tempo em diferentes biomateriais utilizados nas restaurações de RECI. Pretendeu-se ainda avaliar a influência do tempo de presa dos diferentes materiais no comportamento celular.

As variáveis independentes foram o tipo de material, status do tempo de presa (material recentemente misturado ou material com presa completa, quando aplicável) e período de exposição. Já as variáveis dependentes (indicadores de resposta celular) que foram consideradas foram: viabilidade celular, proliferação e adesão celular.

De forma a cumprir o objetivo principal definiu-se o seguinte objetivo específico e respetivas hipóteses:

Avaliar a influência que os diferentes biomateriais utilizados na restauração de RECI, têm no comportamento celular.

H0: Não existem diferenças nas respostas celulares, quando colocadas em contacto direto com diferentes biomateriais utilizados na restauração de RECI.

H1: Existem diferenças nas respostas celulares quando em contacto com diferentes biomateriais utilizados na restauração de RECI.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Desenvolvimento e desinfeção dos discos de suporte

Os discos de acrílico utilizados, neste estudo, foram desenhados em CAD após produção de respetivo ficheiro STL com o objetivo de testar diversos materiais para a confeção dos discos. Por outro lado, foram utilizadas diferentes técnicas de descontaminação prévias à cultura celular, cujo efeito na mesma foi igualmente avaliado.

Foram parte integrante do ensaio de materiais a aplicar nos discos de suporte, os grupos que constam na tabela 3.

Tabela 3 – Descrição dos grupos integrantes no ensaio dos discos de suporte.

DESIGNAÇÃO (GRUPO)	MATERIAL	TRATAMENTO
Zr – BU - UV	Zircónia	Banho ultrassónico + Ultravioleta
Zr - AT	Zircónia	Autoclavagem
Acr – BU - UV	Acrílico	Banho ultrassónico + Ultravioleta
Acr - AT	Acrílico	Autoclavagem
Acr - ST	Acrílico	Sem tratamento

Todos os discos de suporte dos materiais em estudo foram produzidos com um diâmetro de 10 mm e altura 3mm e uma área de espaço de 8mm de diâmetro e 1 mm de altura- Figura 2. Os discos de zircónia foram fresados em ice zirkon translucent (Zirkonzhn, Gais/South Tyrol, Itália) por técnica de fresagem na fresadora M5 (Zirkonzahn, Gais/South Tyrol, Itália). Os discos utilizados em acrílico foram impressos com resina eaterwashable pionext grey plus White (Shenzhen Piocreat 3D Technology Co., Ltd, JinChengYuan, LongHua District, Shenzhen, China), na impressora pionext dj89 50µm Layers (Shenzhen Piocreat 3D Technology Co., Ltd, JinChengYuan, LongHua District, Shenzhen, China),

Para avaliação e seleção do material e da técnica de desinfeção a realizar previamente aos ensaios com os materiais, os discos de suporte foram submetidos a diferentes protocolos de desinfeção. Os discos foram colocados em falcons e lavados com 1ml de hipoclorito de sódio (NaClO), por forma a que todos ficassem imersos. De seguida, removeram-se os discos para tubos de centrifuga contendo água destilada (H2Od) e foram 10 min ao banho ultrassónico

(BU). Posteriormente, aspirou-se H₂O_d e colocou-se etanol (EtOH), 10min em BU, e para finalizar aspirou-se o conteúdo de EtOH e voltou-se a colocar EtOH novo e os discos foram submetidos a UV durante 30min.

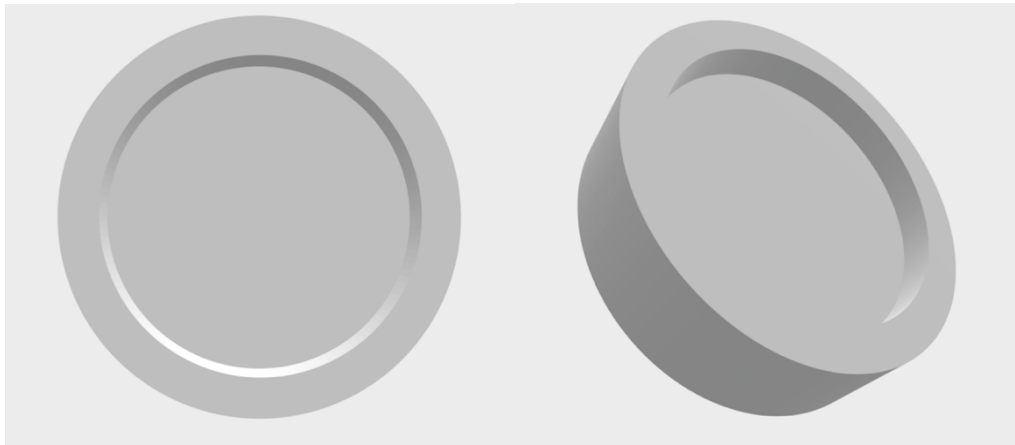


Figura 2 - Desenho esquemático dos discos de suporte.

Procedeu-se à realização de avaliação da biocompatibilidade dos diferentes grupos de materiais de suporte e respetivos protocolos de desinfeção, com N variável, entre 4 a 6, nos quais os discos de suporte esterilizados foram distribuídos em placas de 48 poços (Corning Inc[®], Corning, Nova Iorque, EUA), de acordo com as metodologias de cultura celular posteriormente descritas no ponto 3.

2. Preparação geral dos materiais restauradores

Deste estudo, foram parte integrante os materiais restauradores em estudo ProRoot[®] MTA Root Canal Repair Material, Biodentine[™], GC Fuji II LC[®], SDR[™] dentsply e Biocal[®]-CAP (Harvard[®] dental company), como consta na tabela 4.

Tabela 4 – Grupos e materiais restauradores incluídos no presente estudo.

DESIGNAÇÃO (GRUPO)	NOME DA MARCA	TIPO DE MATERIAL
MTA set	ProRoot® MTA Root Canal Repair Material	Cimento hidráulico de silicato de cálcio (Cimento à base de <i>Portland</i>)
Biodentine set	Biodentine™	Cimento hidráulico de silicato de cálcio
Fuji II	GC Fuji II LC®	Cimento de ionómero de vidro modificado com resina
SDR	SDR™ dentsply	Composto de resina fluída reforçada
Biocal - CAP	Biocal®-CAP	Cimento de MTA modificado com resina
MTA fresco	ProRoot® MTA Root Canal Repair Material	Cimento hidráulico de silicato de cálcio (Cimento à base de <i>Portland</i>)
Biodentine fresco	Biodentine™	Cimento hidráulico de silicato de cálcio

Todos os passos relativos à preparação dos materiais foram levados a cabo de acordo com a técnica asséptica de manipulação, recorrendo a câmara de fluxo laminar (Biobase®, Jinan, China) com todo o material necessário à sua preparação foi esterilizado/ ou desinfetado com álcool a 70%. Todos os materiais restauradores foram preparados e adicionados aos discos de suporte previamente otimizados e selecionados permitindo o preenchimento total do espaço destinado nos discos de suporte de forma a obter-se uma área de superfície de contacto de diâmetro de 8 mm e uma altura de material de 1 mm.

Os materiais com presa prévia foram preparados 24h antes de serem colocados em contacto com as células. Todos os materiais foram preparados de acordo com as normas do fabricante.

O MTA *set* (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) foi preparado segundo as proporções indicadas pelo fabricante e devidamente espatulado em placa de vidro, previamente esterilizada, com auxílio de uma espátula angulada até alcançar a consistência ideal segundo o fabricante, e distribuído por cinco discos de suporte.

No Biodentine *set*, a cápsula de Biodentine™ foi aberta para a colocação de 5 gotas do componente líquido e levada ao vibrador da marca durante 30s, com rotações entre as 4000-

4200/min (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França). De seguida, o material foi distribuído por 5 discos de suporte com o auxílio de espátula angulada, previamente esterilizada.

No Fuji II, a cápsula de GC Fuji II LC[®] foi inicialmente ativada e colocada no vibrador de amálgama durante 10s. O material foi seguidamente colocado nos discos de suporte e submetido a fotopolimerização durante 20s. No final, foi realizado o respetivo polimento com borrachas do sistema enhance (Dentsply Sirona, Charlotte, Carolina do Norte, EUA) em peça de mão (MESTRA, Espanha).

O SDR (SDR[™] dentsply) foi aplicado através de pistola própria diretamente nos 5 discos de suporte e foram fotopolimerizados durante 20s. De seguida, procedeu-se ao respetivo polimento com borrachas do sistema enhance (Dentsply Sirona, Charlotte, Carolina do Norte, EUA) em peça de mão (MESTRA, Espanha).

O Biocal-CAP (Biocal[®]-CAP), material fornecido em seringa, foi aplicado diretamente nos 5 discos de suporte e fotopolimerizado durante 20s.

Durante a noite, todos os materiais preparados foram deixados numa placa de 48 poços numa incubadora adaptada (Memmert[®], Schwabach, Alemanha) em condições ambientais controladas: 5% Dióxido de Carbono (CO²), humidade 98% e uma temperatura de 37°C.

No próprio dia da cultura celular foram preparados os materiais sem presa tomada: MTA fresco (ProRoot[®] MTA Root Canal Repair Material) e Biodentine fresco (Biodentine[™]) tal como descrito anteriormente e aplicados cada um em 5 discos de suporte.

Posteriormente foi realizado os ensaios de avaliação da biocompatibilidade dos diferentes grupos de materiais restauradores em estudo, com N=5 para cada grupo de acordo com as metodologias de cultura celular seguidamente descritas.

3. Culturas celulares e avaliação da biocompatibilidade celular

Por forma a mimetizar as condições *in vivo*, foi utilizada uma linhagem humana primária imortalizada, os Fibroblastos Gengivais Humanos (HGF-hTERT, AMB[®] Canada) recorrendo a uma sexta passagem de cultura. Estas são células primárias obtidas através de biópsia de tecido normal gengival e condicionalmente imortalizadas pelo gene hTERT. Estes últimos foram obtidos a partir do repositório da ATCC[®] (CRL11372[™]; American Culture Collection, Manassas, Virgínia, EUA). Toda a manipulação das culturas celulares foi levada a cabo de acordo com a técnica asséptica de manipulação, recorrendo a câmara de fluxo laminar (Biobase[®], Jinan, China).

As células encontravam-se congeladas em azoto na fase líquida num criocervador Arpege 70 (Air Liquide, França). Foram retiradas do azoto líquido e descongeladas no banho a 37°C, por um tempo não superior a 2 min. O conteúdo dos criotubos foi transferido para tubos de centrífuga tipo Falcon[®] de 15ml, com meio de cultura composto por uma mistura de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - Lonza[®], Suíça), 10% de Soro Bovino Fetal (Biowest[®], França) e 1% Penicilina com streptomina (G255 Applied Biological Materials Inc, Richmond, BC, Canada). As células foram centrifugadas a 777rpm (correspondente a 125g) durante 5 min. Após a remoção do sobrenadante sem desorganização do *pellet*, as células foram ressuspensas no volume de 15ml de novo meio num frasco de cultura de 75 cm³ (VWR[™], Radnor, Pensilvânia, EUA).

As células foram seguidamente cultivadas numa incubadora adaptada (Memmert[®], Schwabach, Alemanha) em condições ambientais controladas: 5% Dióxido de Carbono (CO₂), humidade 98% e uma temperatura de 37°C. O meio de cultura do frasco foi trocado após 1 dia de cultura inicial e durante a fase de multiplicação e crescimento a cada 2 dias.

Quando as células atingiram uma confluência de aproximadamente 90%, procedeu-se ao destacamento enzimático destas células da superfície de crescimento, utilizando Tripsina – EDTA (Lonza[™], Basileia, Suíça). Esta enzima proteolítica é utilizada para cultivo de células primárias, uma vez que, fragmenta o tecido e cliva ligações entre as células, ao quebrar as proteínas nos grupos carboxilos dos aminoácidos lisina e arginina, existentes na parede celular. Desta forma, cria-se uma suspensão de células únicas.

A contagem do número de células viáveis foi efetuada recorrendo à contagem na câmara de Neubauer (Laboroptik, Ltd., Lancing, Reino Unido) com recurso à coloração de células mortas por Trypan-Blue (AMRESCO[®], Solon, Ohio, EUA), num microscópio invertido de contraste de fase (Olympus CK2). Foi preparada uma suspensão de células com volume final. Utilizando uma micropipeta de 20-200 µl com uma ponta estéril, retiraram-se 30µl dessa suspensão, foram transferidos para um tubo de Eppendorf e foram posteriormente misturados e homogeneizados com 30µl de Trypan-Blue. Com uma pipeta foi retirado 10µl da suspensão celular com Trypan-Blue e aplicado num hemocitómetro. Com microscópio ótico, foram focadas as linhas da grelha constituídas por 16 pequenos quadrados e contadas as células vivas (células não tingidas por Trypan-Blue) presentes no interior de todos estes quadrados. De acordo com o protocolo preconizado, é adotado um sistema de contagem de células das linhas superiores e das linhas direitas, não se contabilizando as que se encontram nas linhas inferiores e nas linhas esquerdas dos quadrados. Ao contarmos o número de células presentes em cada conjunto de 16 quadrados, realizou-se a média dos 4 conjuntos de 16 quadrados, multiplicou-se por 10 000 e dividiu-se por 0,5, por forma a obter-se uma diluição correta devido à adição do Trypan-blue. Obteve-se assim, uma quantidade de células necessárias para cada ensaio, garantindo uma densidade de 1×10^4 células em 500µl de meio de cultura por poço, permitindo manter o comportamento desta linhagem imortalizada.

Os discos de suporte esterilizados foram distribuídos em placas de 48 poços (Corning Inc[®], Corning, Nova Iorque, EUA), com um N= 5 para cada grupo por ensaio.

3.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular e proliferação foram avaliadas utilizando um ensaio de viabilidade baseado na redução de rezasurina em resasorfina com o reagente Cell-TiterBlue[®] (Promega[®], Madison, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Este permite medir a atividade metabólica celular baseada na conversão do corante azul não-fluorescente de rezasurina pelas mitocôndrias num produto fluorescente irreversível de resasorfina.

A taxa de conversão do corante azul não-fluorescente (possível apenas em mitocôndrias de células viáveis) foi determinada como intensidade de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrária (UA), depois de, 1, 3, 7 dias de cultura.

A intensidade de fluorescência foi detetada a comprimentos de onda de excitação 530/30nm e emissão 595/10nm utilizando um leitor multimodo de microplacas (VICTOR Nivo™ HH3500, perkinElmer®, Pontyclum, Reino Unido).

4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software IBM® SPSS 28.0 para Mac (SPSS, Chicago, EUA) e Graphpad Prism 8 para Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, EUA).

A confirmação da distribuição normal das amostras foi realizada para vários grupos através dos testes Shapiro-Wilk e Kolgromov-Smirnov. A comparação entre grupos para a viabilidade celular foi realizada com base na análise da variância em 1 sentido (*One-way* ANOVA) e a análise de variância em 2 sentidos de medidas repetidas com recorrência (*Two-way repeated measures - ANOVA*), com recurso a testes *post-hoc* Tukey's para identificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos. O nível de significância foi estabelecido a $p < 0,05$. Todos os resultados foram apresentados como uma média \pm desvio padrão (DP).

4.1 Cálculo dimensional da amostra e poder estatístico

A estimativa da dimensão da amostra para cada uma das hipóteses testadas foi realizada com base numa taxa de erro tipo I (α) de 0,05 e de poder estatístico de 0,80 (β).

Foi determinado através de um simulador para cálculo do poder estatístico G*Power 3.1.9.0. for Mac, (Dussldorf, Alemanah) ⁽⁵⁵⁾ foi determinado um N de 4 e 6 para os discos de suporte e um N=15 para cada grupo de materiais como necessário para detetar uma dimensão de efeito de 1,4 tendo em conta o poder estatístico definido (0,80).

RESULTADOS

1. Culturas e comportamento celular – Discos de Suporte e protocolos de desinfecção

1.1 Viabilidade

De acordo com os resultados obtidos para a viabilidade celular, observou-se um aumento ao longo do tempo no grupo Zr – BU - UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta). Nos grupos Acr – BU – UV (Acrílico – Banho ultrassónico – Ultravioleta) e Acr – AT (Acrílico – Autoclavagem), verificou-se um aumento de viabilidade das 24h para as 48h. Já no grupo Acr- ST (Acrílico – Sem tratamento) verificou-se uma manutenção dos resultados de viabilidade ao longo do tempo.

Nos grupos grupo Zr – BU - UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta) e Acr – BU – UV (Acrílico – Banho ultrassónico – Ultravioleta) os resultados parecem aumentar ao longo do tempo contrariamente aos restantes grupos. Às 24h o grupo Zr – BU - UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta) apresenta resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo. Às 48h o grupo Zr-AT (Zircónia - Autoclavagem) apresenta resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo. Às 72h o grupo Zr – BU - UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta) apresenta resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo.

Ao realizar o teste *two-way* ANOVA de medidas repetidas com o teste post-hoc de Tukey verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr -AT (Acrílico – Autoclavagem) e Acr -ST (Acrílico – Sem tratamento) e entre as médias do grupos Acr – BU – UV (Acrílico – Banho ultrassónico – Ultravioleta), Acr -AT(Acrílico – Autoclavagem) e Acr -ST (Acrílico – Sem tratamento), ao longo do tempo ($p < 0,05$).

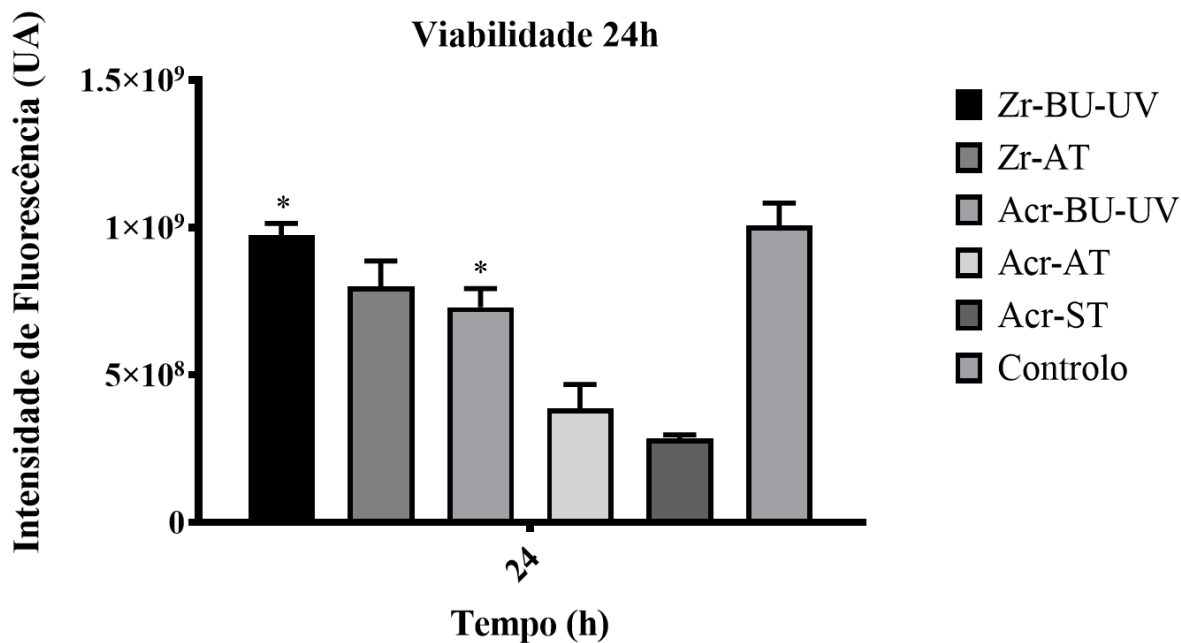


Gráfico 1 - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 24h de cultura.

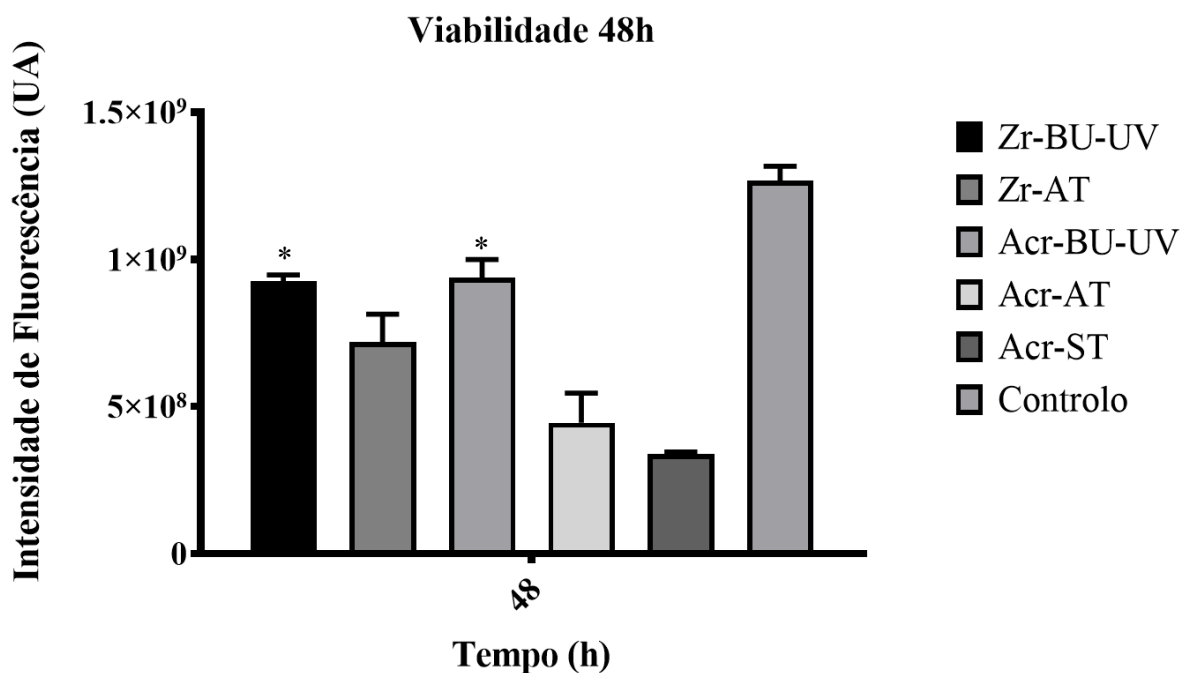


Gráfico 2 - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 48h de cultura.

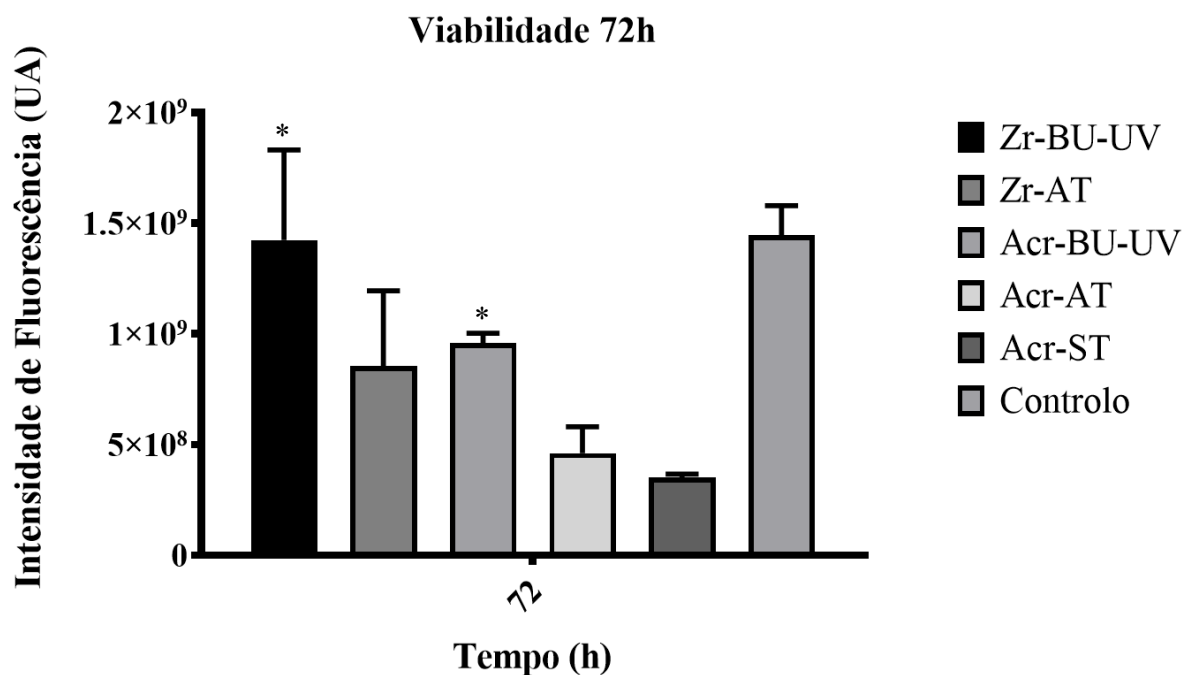


Gráfico 3 - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 72h de cultura.

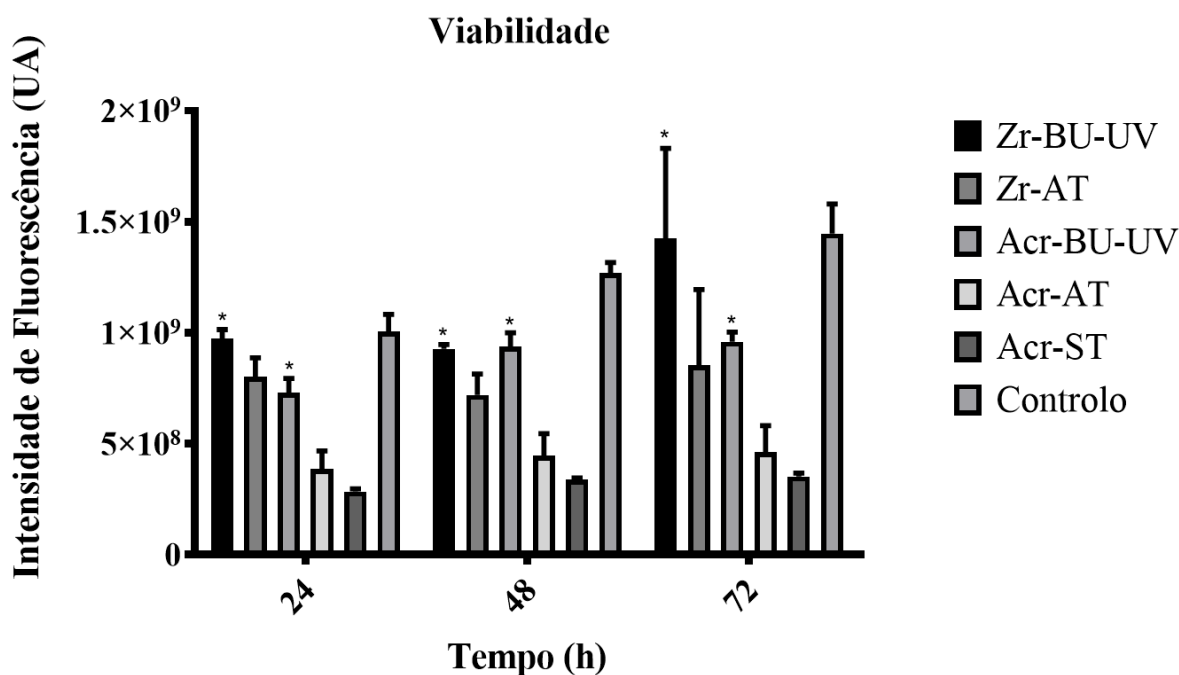


Gráfico 4 - Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos Zr – BU – UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Acr – BU – UV (Acrílico - Banho ultrassónico - Ultravioleta), Zr – AT (Zircónia - Autoclavagem), Acr – AT (Acrílico - Autoclavagem), Acr – ST (Acrílico – Sem tratamento) às 24h, 48h e 72h de cultura.

2. Culturas e comportamento celular - Materiais

2.1. Viabilidade

De acordo com os resultados obtidos para a viabilidade celular, o grupo do Biocal-CAP (Biocal®-CAP) apresentou resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo, sendo seguido pelo grupo do Fuji II (GC Fuji II LC®). No 1º dia, grupo do Biocal-CAP (Biocal®-CAP) apresentou resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo. No 3º dia, os resultados entre grupos não diferiram muito entre si. Já no 7º dia, o grupo Biocal-CAP (Biocal®-CAP) apresenta resultados de viabilidade celular estatisticamente superiores a todos os grupos em estudo.

Ao realizar o teste *two-way* ANOVA de medidas repetidas com o teste post-hoc de Tukey verificou-se diferenças estatisticamente significativas do Biocal-CAP (Biocal®-CAP) face aos restantes materiais ao longo do tempo. Ao 3º dia também se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o Fuji II (GC Fuji II LC®) e o MTA set (ProRoot® MTA

Root Canal Repair Material) e ao 7º dia entre o Biodentine set (Biodentine™) e o MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ($p < 0,05$).

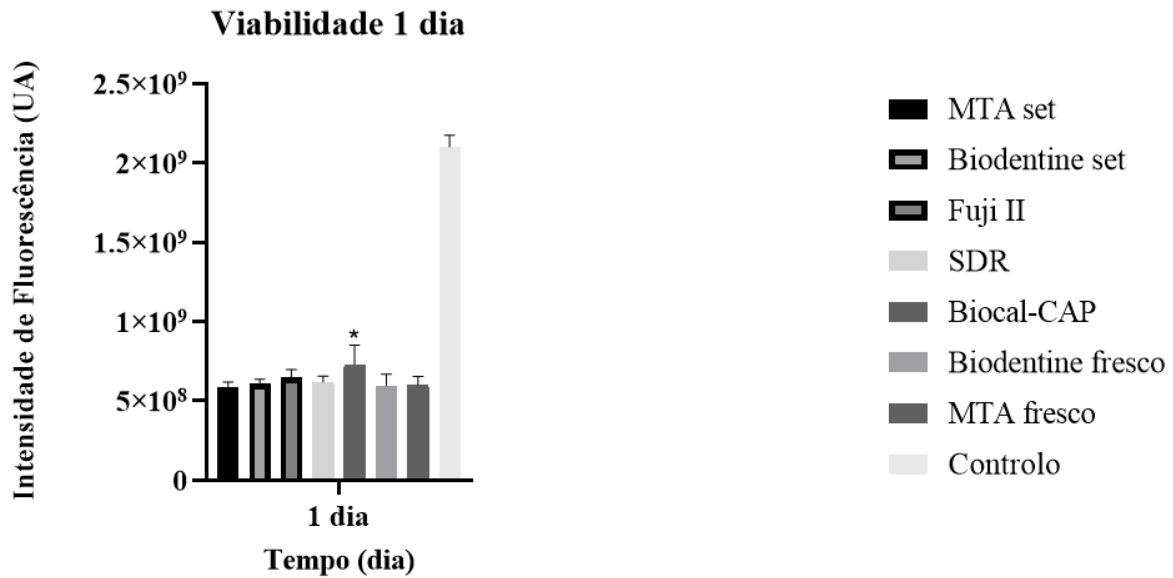


Gráfico 5 – Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material), Biodentine set (Biodentine™), Fuji II (GC Fuji II LC®), SDR (SDR™ dentsply), Biocal-CAP (Biocal®-CAP), Biodentine fresco (Biodentine™), MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ao 1º dia de cultura.

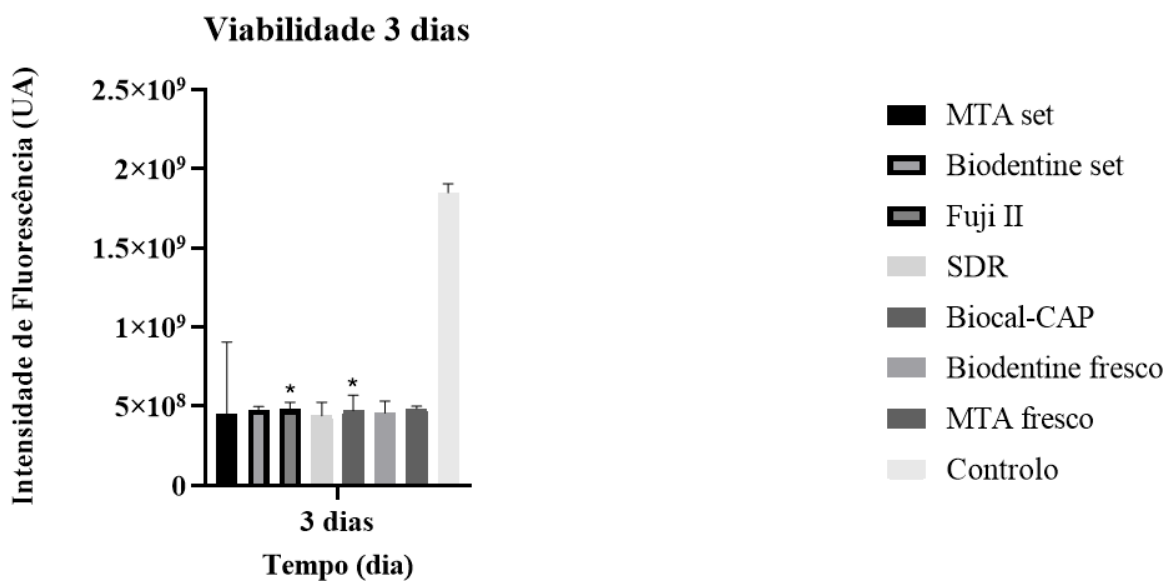


Gráfico 6 – Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material), Biodentine set (Biodentine™), Fuji II (GC Fuji II LC®), SDR (SDR™ dentsply), Biocal-CAP (Biocal®-CAP), Biodentine fresco (Biodentine™), MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ao 3º dia de cultura.

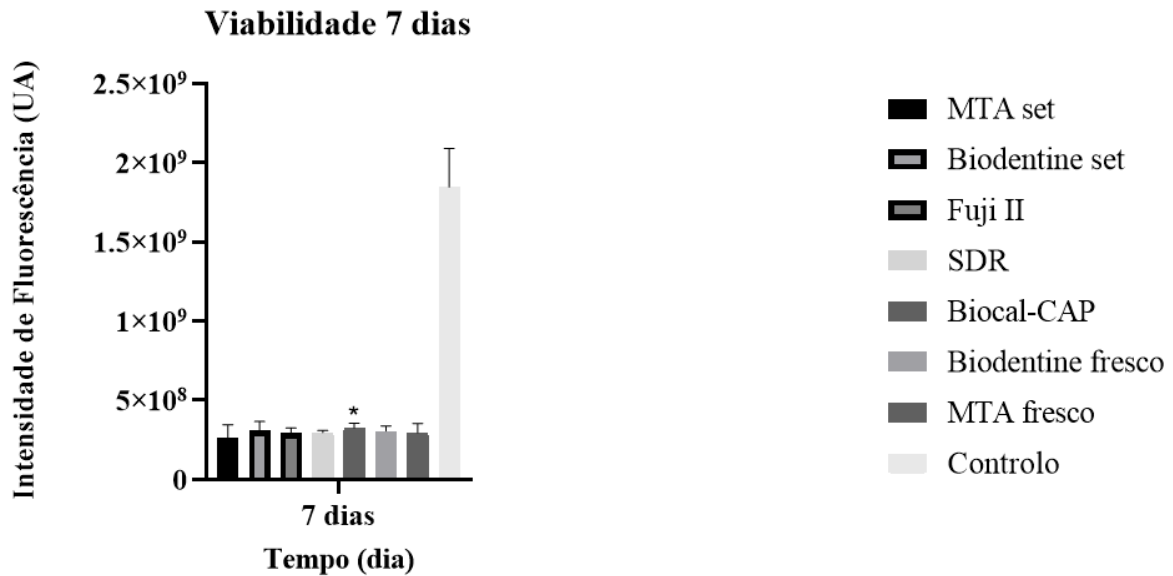


Gráfico 7 – Resultados da viabilidade celular como média +/- desvio padrão em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência (UA) dos grupos MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material), Biodentine set (Biodentine™), Fuji II (GC Fuji II LC®), SDR (SDR™ dentsply), Biocal-CAP (Biocal®-CAP), Biodentine fresco (Biodentine™), MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ao 7º dia de cultura.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi um estudo piloto, sendo por isso um estudo de singular importância no que diz respeito à possibilidade de testar e avaliar parâmetros e protocolos de atuação, por forma a planear de forma mais cuidada estudos futuros nesta mesma área.

Para alcançar o objetivo inicialmente proposto foi desenvolvido um modelo de estudo que permitisse a testagem dos materiais de forma reprodutível e que pudesse também ele ser aplicado em estudos futuros relacionados com esta temática. O desenvolvimento deste mesmo modelo de estudo foi bem sucedido.

Para tal, foi inicialmente concebido um ficheiro STL para a produção de discos de suporte, criado um protocolo de descontaminação para os discos de suporte e procedeu-se ao estudo do comportamento celular face a dois materiais: Zircónia e Acrílico. Estes discos de suporte foram criados com o intuito de se alcançar uma estabilização efetiva para os materiais restauradores aquando do contacto com as células. O comportamento celular dos seguintes materiais restauradores foi, posteriormente avaliado. Este estudo piloto incluiu um material recente com poucos estudos associados, que se tratou do Biocal – CAP (Biocal®-CAP).

Relativamente, à confeção dos discos deparámo-nos com algumas dificuldades em alcançar o ficheiro STL mais indicado, na medida em que nos encontrávamos limitados pela dimensão dos poços da placa de 48.

Relativamente, à escolha do material para os suportes, foram testados dois materiais: Zircónia e Acrílico. Estes foram submetidos a diferentes técnicas de descontaminação e verificou-se que a zircónia apresentou níveis mais adequados de biocompatibilidade, sendo o banho ultrassónico, seguido da aplicação da radiação ultravioleta, a modalidade de tratamento que apresentou uma menor influência no comportamento celular. Estes resultados encontram-se em concordância com a literatura, visto que, a zircónia tem apresentado resultados superiores face ao acrílico.⁽⁶⁰⁾ Idealmente, a escolha recairia sobre a zircónia, no entanto, o comportamento apresentado pelo acrílico também foi satisfatório, não havendo diferenças no comportamento da Zr-BU-UV (Zircónia - Banho ultrassónico - Ultravioleta), e Acr -BU-UV (Acrílico - Banho ultrassónico – Ultravioleta), o que nos poderia conduzir à escolha de ambos. No entanto, o acrílico apresenta uma melhor relação benefício/custo, o que conduz a uma maior acessibilidade

ao fabrico de um maior número de suportes. Foram estas as principais razões que levaram à escolha do acrílico em detrimento da zircónia.

Não existindo nenhum consenso na escolha do material ideal a aplicar em contextos de RECI, foram incluídos, neste estudo, os materiais mais comumente utilizados.⁽²⁷⁾ Inclui-se um novo material, Biocal-CAP (Biocal®-CAP), cujo próprio fabricante não indica a sua aplicação em contexto de RECI, testando assim desta forma, se o comportamento de fibroblastos em contacto com este material o torna compatível com esta possível aplicação, no que respeita. À resposta biológicas. Procurou-se colocar os materiais em contacto direto com as células, aproximando o máximo possível do contexto que se verifica na cavidade oral.

De forma geral, comparando todos os materiais, o Biocal-CAP (Biocal®-CAP) parece ter um comportamento de maior biocompatibilidade, ao longo do tempo. O Fuji II (GC Fuji II LC®) foi o segundo material que se destacou. Nos estudos de *Michel et al*, verificou-se que o Fuji II (GC Fuji II LC®) parece ser significativamente menos tóxico sendo que, as células humanas primárias se ligam a este mesmo material *in vitro*.⁽³⁰⁾

Em comparação dos materiais ProRoot® MTA Root Canal Repair Material e Biodentine™ nos diferentes estados de presa, não se verificaram diferenças significativas, com a exceção ao 3º dia o MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) apresentou resultados inferiores comparativamente ao MTA fresco (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) ($p=0,047$); e ao 7º dia o MTA set (ProRoot® MTA Root Canal Repair Material) apresentou resultados inferiores em relação ao Biodentine set (Biodentine™) ($p=0,022$). Estudos revelam uma biocompatibilidade semelhante entre o Biodentine™ e o ProRoot® MTA Root Canal Repair Material, observando, ainda, ausência de citotoxicidade para o Biodentine™.^(61,62,63)

No caso dos discos de suporte que continham o Biocal-CAP (Biocal®-CAP) estes, não apresentaram resistência face às variações dimensionais dos materiais. Este fenómeno verificou-se logo nas primeiras 24h de incubação. A superfície topográfica dos biomateriais constitui um fator importante que determina a forma como as células interagem com os mesmos. Tendo em conta, que existe uma rugosidade considerada ótima face à adesão celular, é de destacar as diferentes rugosidades aparentes macroscopicamente que se verificaram nos materiais que foram testados com potencial para influenciar o comportamento celular. No

entanto, e considerando que a rugosidade não foi um parâmetro avaliado neste estudo, será importante em estudos futuros determinar os valores de rugosidade dos diferentes materiais e a contribuição desta variável para o comportamento celular.

Tratando-se este de um estudo *in vitro*, os resultados que se obtiveram não podem ser extrapolados diretamente para a atividade clínica. Neste estudo, foram utilizadas linhagens celulares e não células primárias. O protocolo elaborado no presente estudo, procurou ser o mais fiel possível ao procedimento clínico, daí derivou a incapacidade de padronização da superfície e da sua rugosidade, à semelhança do que acontece em contexto clínico.

Estudos futuros deverão procurar verificar outros fatores relevantes, com a caracterização mais abrangente do comportamento celular, incluindo o perfil de diferenciação, expressão de proteínas relacionadas com a adesão, expressão de genes relevantes para o selamento conjuntivo e epitelial, estudos microbiológicos e estudos mecânicos dos materiais e propriedades de superfície.

Além de estudos *in vitro* é, sem dúvida, também importante a realização de estudos *in vivo*, em sistemas biológicos mais complexos, por forma a validar a aplicação clínica no contexto de RECI.

Apesar das suas limitações, este estudo piloto desenvolveu modelos de estudo que contribuem para a sua reprodutibilidade e promovem a sua aplicabilidade em estudos futuros.

Os resultados face ao novo material, Biocal®-CAP, parecem promissores, no entanto, carecem de mais estudos. Para a confirmação das propriedades mecânicas e químicas dos presentes materiais mais estudos deverão ser realizados.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, foi possível concluir que o Biocal-CAP (Biocal®-CAP), poderá representar um material promissor no que respeita à sua biocompatibilidade com células periodontais, podendo eventualmente considerar-se a sua aplicabilidade clínica à reparação de RECI no que respeita à compatibilidade biológica. No entanto, mais estudos serão necessários por forma a comprovar a sua adequação do ponto de vista mecânico e microbiológico.

Portanto, será importante continuar a testar estes e outros materiais que possam realmente marcar a diferença em contextos de RECI, de forma a confirmar a existência de vantagens biológicas na sua utilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antonelli JR, Hottel TL, Brandt R, Scarbecz M, Patel T. The role of occlusal loading in the pathogenesis of non-carious cervical lesions. *American journal of dentistry*. 2013;26(2):86-92.
2. Ahmed H, Durr ES, Rahman M. Factors associated with Non-Carious Cervical Lesions (NCCLs) in teeth. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan : JCPSP*. 2009;19(5):279-82.
3. Que K, Guo B, Jia Z, Chen Z, Yang J, Gao P. A cross-sectional study: non-carious cervical lesions, cervical dentine hypersensitivity and related riskfactors. *Journal of oral rehabilitation*. 2013;40(1):24-32.
4. Benazzi S, Nguyen HN, Schulz D, Grosse IR, Gruppioni G, Hublin JJ, et al. The evolutionary paradox of tooth wear: simply destruction or inevitable adaptation? *PloS one*. 2013;8(4):e62263.
5. Bignozzi I, Littarru C, Crea A, Vittorini Orgeas G, Landi L. Surgical treatment options for grafting areas of gingival recession association with cervical lesions: a review. *Journal of esthetic and restorative dentistry : official publication of the American Academy of Esthetic Dentistry [et al]*. 2013;25(6):371-82.
6. Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss:a literature review. *Journal of dentistry*. 2008;36(10):759-66.
7. Osborne-Smith KL, Burke FJ, Farlane TM, Wilson NH. Effect of restored and unrestored non-carious cervical lesions on the fracture resistance of previously restored maxillary premolar teeth. *Journal of dentistry*. 1998;26(5-6):427-33.
8. Pereira AdFV. Uma revisão sobre lesões de abfração: conceitos atuais. *RGD*. 2008;56(3):321-6.
9. Patel S, Lambrechts P, Shemesh H, Mavridou A. European Society of Endodontology position statement: External Cervical Resorption. *International Endodontic Journal*. 2018 Dec 1;51(12):1323–6.
10. Mavridou AM, Hauben E, Wevers M, Schepers E, Bergmans L, Lambrechts P. Understanding External Cervical Resorption in Vital Teeth. *Journal of Endodontics*. 2016 Dec 1;42(12):1737–51.
11. Patel S, Saberi N. The ins and outs of root resorption. *British Dental Journal*. 2018 May 11;224(9):691–9.

12. Luso S, Luder HU. Resorption pattern and radiographic diagnosis of invasive cervical resorption. A correlative microCT, scanning electron and light microscopic evaluation of a case series. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO*. 2012;122(10):914–30.
13. Rotondi O, Waldon PA, Kim SG. The disease process, diagnosis and treatment of invasive cervical resorption: A review. Vol. 8, *Dentistry Journal*. MDPI AG; 2020.
14. Root resorption-etiology, terminology and clinical manifestations. *OralPathology*. 2016.
15. Mavridou AM, Bergmans L, Barendregt D, Lambrechts P. Descriptive Analysis of Factors Associated with External Cervical Resorption. *Journal of Endodontics*. 2017 Oct 1;43(10):1602–10.
16. Mavridou AM, Hauben E, Wevers M, Schepers E, Bergmans L, Lambrechts P. Understanding external cervical resorption patterns in endodontically treated teeth. *International Endodontic Journal*. 2017 Dec 1;50(12):1116–33.
17. Patel S, Mavridou AM, Lambrechts P, Saberi N. External cervical resorption-part 1: histopathology, distribution and presentation. Vol. 51, *International Endodontic Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 1205–23.
18. Schwartz RS, Robbins JW, Rindler E. Management of invasive cervical resorption: Observations from three private practices and a report of three cases. *Journal of Endodontics*. 2010 Oct;36(10):1721–30.
19. Wedenberg C, Lindskog S. Evidence for a resorptioe inhibitor in dentiii.
20. Patel K, Mannocci F, Patel S. The Assessment and Management of External Cervical Resorption with Periapical Radiographs and Cone-beam Computed Tomography: A Clinical Study. *Journal of Endodontics*. 2016 Oct 1;42(10):1435–40.
21. Trope M. Root Resorption due to Dental Trauma General principles Protective mechanisms against resorption. Vol. 1. 2002.
22. Iqbal MK. Clinical and scanning electron microscopic features of invasive cervical resorption in a maxillary molar. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2007 Jun;103(6).
23. Bender IB, Seltzer S. Roentgenographic and Direct Observation of Experimental Lesions in Bone: II †. 1961.

24. Patel S, Dawood A, Wilson R, Horner K, Mannocci F. The detection and management of root resorption lesions using intraoral radiography and cone beam computed tomography - an in vivo investigation. *International Endodontic Journal*. 2009 Sep;42(9):831–8.
25. Vaz de Souza D, Schirru E, Mannocci F, Foschi F, Patel S. External Cervical Resorption: A Comparison of the Diagnostic Efficacy Using 2 Different Cone-beam Computed Tomographic Units and Periapical Radiographs. *Journal of Endodontics*. 2017 Jan 1;43(1):121–5.
26. Gunst V, Mavridou A, Huybrechts B, van Gorp G, Bergmans L, Lambrechts P. External cervical resorption: An analysis using cone beam and microfocus computed tomography and scanning electron microscopy. *International Endodontic Journal*. 2013 Sep;46(9):877–87.
27. Patel S, Foschi F, Condon R, Pimentel T, Bhuvu B. External cervical resorption: part 2 – management. Vol. 51, *International Endodontic Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2018. p. 1224–38.
28. Heithersay GS. Invasive cervical resorption.
29. Szesz A, Parreiras S, Martini E, Reis A, Loguercio A. Effect of flowable composites on the clinical performance of non-carious cervical lesions: A systematic review and meta-analysis. Vol. 65, *Journal of Dentistry*. Elsevier Ltd; 2017. p. 11–21.
30. Michel A, Erber R, Frese C, Gehrig H, Saure D, Mente J. In vitro evaluation of different dental materials used for the treatment of extensive cervical root defects using human periodontal cells. *Clinical Oral Investigations*. 2017 Apr 1;21(3):753–61.
31. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. Vol. 24, *Dental Materials*. 2008. p. 149–64.
32. Camilleri J. Classification of Hydraulic Cements Used in Dentistry. *Frontiers in Dental Medicine*. 2020 Sep 8;1.
33. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing Ability of a Mineral Trioxide Aggregate for Repair of Lateral Root Perforations. Vol. 19. 1993.
34. Multifaceted Use of ProRoot™ MTA Root Canal Repair Material.
35. Katsamakidis S, Slot DE, van der Sluis LWM, van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: A systematic review. Vol. 40, *Journal of Clinical Periodontology*. 2013. p. 334–44.

36. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. Vol. 36, Journal of Endodontics. 2010. p. 190–202.
37. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. 2005.
38. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis R v., Ford TRP. The constitution of mineral trioxide aggregate. Dental Materials. 2005 Apr;21(4):297–303.
39. Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. Dental Materials. 2005 Aug;21(8):731–8.
40. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. Journal of Endodontics. 2011 May;37(5):673–7.
41. Nagas E, Uyanik MO, Eymirli A, Cehreli ZC, Vallittu PK, Lassila LVJ, et al. Dentin moisture conditions affect the adhesion of root canal sealers. Journal of Endodontics. 2012 Feb;38(2):240–4.
42. Pontius V, Pontius O, Braun A, Frankenberger R, Roggendorf MJ. Retrospective evaluation of perforation repairs in 6 private practices. Journal of Endodontics. 2013 Nov;39(11):1346–58.
43. Mente J, Leo M, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: Repair of root perforations - Long-term results. Journal of Endodontics. 2014;40(6):790–6.
44. Krupp C, Bargholz C, Brüsehauer M, Hülsmann M. Treatment outcome after repair of root perforations with mineral trioxide aggregate: A retrospective evaluation of 90 teeth. Journal of Endodontics. 2013 Nov;39(11):1364–8.
45. Yilmaz HG, Kalender A, Cengiz E. Use of Mineral Trioxide Aggregate in the Treatment of Invasive Cervical Resorption: A Case Report. Journal of Endodontics. 2010 Jan;36(1):160–3.
46. Fernández R, Rincón JG. Surgical endodontic management of an invasive cervical resorption class 4 with mineral trioxide aggregate: A 6-year follow-up. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology. 2011 Nov;112(5).

47. Kim SY, Yang SE. Surgical repair of external inflammatory root resorption with resin-modified glass ionomer cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2011 Apr;111(4).
48. Bezerra IM, Brito ACM, de Sousa SA, Santiago BM, Cavalcanti YW, de Almeida L de FD. Glass ionomer cements compared with composite resin in restoration of noncarious cervical lesions: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*. 2020 May 1;6(5).
49. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dental Materials*. 2008 Dec;24(12):1702–8.
50. Agha A, Parker S, Parkinson EK, Patel M. Characteristics of experimental resin-modified glass-ionomer cements, containing alternate monomers to HEMA. *Dental Materials*. 2021 Oct 1;37(10):1542–52.
51. Perdigão J, Dutra-Corrêa M, Saraceni SHC, Ciaramicoli MT, Kiyon VH. Randomized clinical trial of two resin-modified glass ionomer materials: 1-year results. *Operative Dentistry*. 2012 Nov;37(6):591–601.
52. Kubo S, Yokota H, Yokota H, Hayashi Y. Three-year clinical evaluation of a flowable and a hybrid resin composite in non-carious cervical lesions. *Journal of Dentistry*. 2010 Mar;38(3):191–200.
53. Loguercio AD, Mânica D, Ferneda F, Zander-Grande C, Amaral R, Stanislawczuk R, et al. A Randomized Clinical Evaluation of a One- And Two-step Self-etch Adhesive over 24 Months. *Operative Dentistry*. 2010 May;35(3):265–72.
54. Oginni AO, Adeleke AA. Comparison of pattern of failure of resin composite restorations in non-carious cervical lesions with and without occlusal wear facets. *Journal of Dentistry*. 2014;42(7):824–30.
55. Heintze SD, Ruffieux C, Rousson V. Clinical performance of cervical restorations - A meta-analysis. Vol. 26, *Dental Materials*. Elsevier Inc.; 2010. p. 993–1000.
56. Wood I, Jawad Z, Paisley C, Brunton P. Non-carious cervical tooth surface loss: A literature review. Vol. 36, *Journal of Dentistry*. 2008. p. 759–66.
57. Miao C, Yang X, Wong MCM, Zou J, Zhou X, Li C, et al. Rubber dam isolation for restorative treatment in dental patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021 May 17;2021(5).

58. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RGE, Anthonappa RP. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a 3 year literature review and update. Vol. 19, European Archives of Paediatric Dentistry. Springer Verlag; 2018.
59. Malkondu Ö, Kazandağ MK, Kazazoğlu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. Vol. 2014, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
60. Altan B, Cinar S, Tuncelli B. Evaluation of shear bond strength of zirconia-based monolithic CAD-CAM materials to resin cement after different surface treatments. Nigerian Journal of Clinical Practice. 2019;22(11):1475.
61. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate Induce Similar Cellular Responses in a Fibroblast Cell Line. Journal of Endodontics. 2014 Mar;40(3):406–11.
62. Silva E, Senna P, De-Deus G, Zaia A. Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. International Endodontic Journal. 2015;49(6):574-580.
63. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behav Res Methods. 2007;39(2):175-91.