

CULTURA DE FIBROBLASTOS L 929 SOBRE DISCOS
DE DENTINA HUMANA. AVALIAÇÃO EM
MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE
E ELETRÔNICA DE VARREDURA

Carlos Alberto de Souza COSTA*
Carl Thomas HANKS**

- RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar, de maneira preliminar, a capacidade dos fibroblastos L929 sobreviver e se multiplicar quando cultivados sobre discos de dentina humana condicionados com agentes ácidos. Para isso, 10.000 células/cm² foram cultivadas por 24 ou 48 horas sobre discos de dentina previamente condicionados com ácido cítrico 50% por 30 segundos, com EDTA 0,5 M por 120 segundos (Grupos Experimentais) ou sobre substrato plástico (Grupos Controle). Decorridos os períodos experimentais, as células foram tratadas com fluorescein diacetate (FDA) e finalmente contadas em microscopia de Contraste de Fase. A morfologia celular foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Fibroblastos L 929 sobreviveram, multiplicaram-se e apresentaram semelhante morfologia quando cultivados em ambos os substratos avaliados. Os discos de dentina tratados com ácido cítrico exibiam maior número de células do que para os demais grupos Experimentais e Controle, sendo esta observação comprovada pela análise estatística de ANOVA e a complementar de Fisher.
- PALAVRAS-CHAVE: Dentina; fibroblastos; ataque ácido dentário.

* Departamento de Patologia e Fisiologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 Araraquara – SP.

** Department of Oral Medicine, Pathology and Oncology – University of Michigan – School of Dentistry – Ann Arbor – 49108-1078 – Michigan – USA.

Introdução

Os testes de Biocompatibilidade dos materiais odontológicos vêm passando por notáveis evoluções nas últimas décadas. Nesta área de pesquisa, os variados testes e metodologias aplicadas foram divididos em níveis, os quais devem ser seguidos e cumpridos, com o objetivo de avaliar de maneira completa a reação provocada pelos materiais odontológicos e/ou seus componentes.¹³

Tanto nos testes in vivo, quanto nos testes de “uso”, há dificuldade na padronização e estandarização das reações, além do alto custo para execução dessas pesquisas.¹² Dessa forma, muita atenção e investimentos têm sido dispensados para os testes in vitro, pois, além de serem mais bem estandarizados do que os testes in vivo, são de rápida execução e de custos relativamente baixos.¹⁹

Nos últimos anos, os testes in vitro tiveram acentuada evolução com o desenvolvimento de um modelo experimental denominado “in vitro pulp device” (IVPD).^{3, 7, 8, 9} Essa câmara pulpar in vitro (IVPD) aproxima os testes de citotoxicidade e difusão dentinária dos materiais odontológicos, daquelas situações clínicas onde se requer o forramento cavitário. Nesse modelo experimental, existem dois compartimentos divididos por um disco de dentina, o qual simula o assoalho cavitário. O compartimento superior é usado como a cavidade dentária, e o inferior como a polpa coronária. Na base do compartimento pulpar são cultivadas as células. Quando um material odontológico ou seus componentes são aplicados sobre o disco de dentina, pode-se avaliar a capacidade ou não dele se difundir através dos túbulos dentinários e alcançar o compartimento pulpar. Quando isso ocorre, o material difundido deverá atravessar todo o compartimento pulpar, o qual é preenchido por líquido, e finalmente entrar em contato com as células cultivadas sobre plástico posicionado na base do compartimento inferior (pulpar). Nesse deslocamento, o material difundido pode se solubilizar no “fluido intra pulpar”, e apenas uma pequena quantidade dele poderá atuar sobre as células. Esse mecanismo parece interferir na avaliação dos resultados da citotoxicidade do material em teste.

Com o objetivo de prevenir essa situação, e ao mesmo tempo fazer que a IVPD apresente características semelhantes ao complexo dentina-polpa in vivo, tentativas de cultivar células sobre discos de dentina humana estão sendo realizadas. Dessa forma, o material que tiver a

capacidade de difundir através do disco de dentina, entrará diretamente em contato com células adjacentes, da mesma forma como ocorre no dente humano, onde existe a camada odontoblástica revestindo internamente a câmara pulpar. Assim, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi avaliar, de maneira preliminar, a capacidade das células L 929 sobreviver e se multiplicar sobre discos de dentina humana, submetidos a dois diferentes tratamentos ácidos prévios. Também foi comparada a morfologia das células presentes sobre dentina e plástico.

Material e método

Vinte e quatro discos de dentina foram obtidos a partir de molares humanos íntegros, os quais, após extração, foram mantidos em etanol 70% à temperatura ambiente por 5 dias. Os dentes foram submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal e debris, que estavam aderidos à sua superfície, utilizando-se para isto, instrumentos cirúrgicos. Estes mesmos dentes foram cortados transversalmente, utilizando-se um aparelho de baixa velocidade (230 rpm), no qual foi posicionado um disco de diamante (CO-153, 320 grit; Mager Scientific Inc., Dexter MI). Os discos de dentina recém-cortados foram lixados com lixas d'água número 450 e posteriormente 600, realizando para isso, 20 movimentos giratórios manuais para cada granulação dos papéis/lixa. Os discos foram então lavados com tampão fosfato (PBS, pH = 7,4) e verificaram-se suas superfícies com o objetivo de observar a presença ou não de esmalte e/ou sinais de corno pulpar. Quando isso ocorreu, os discos de dentina foram descartados do estudo. Os discos de dentina, com 0,5 mm de espessura, foram mantidos em etanol 70% por mais 5 dias. Normalmente, apenas um disco foi obtido de cada dente.

Após lavagem dos discos por 3 vezes em PBS, foi realizado o seu condicionamento com ácido cítrico a 50% por 30 segundos ou EDTA 0,5 M por 2 minutos. Os discos de dentina foram divididos em 4 grupos experimentais e 2 controle, como se observa no Quadro 1. Após o condicionamento ácido, os discos foram novamente lavados por 3 vezes em PBS e posteriormente 3 vezes em meio de cultura-MEM (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro bovino fetal-FBS (Gibco Laboratories).

Quadro 1 – Relação entre os grupos experimentais, tratamento e número de discos de dentina por tempo de crescimento de fibroblastos L 929

Grupos	Tempo	Discos (D ou P)	Tratamento
1	24 h	6-P	-
2	48 h	6-P	-
3	24 h	6-D	EDTA – 2 minutos
4	48 h	6-D	EDTA – 2 minutos
5	24 h	6-D	Ácido cítrico – 30 segundos
6	48 h	6-D	Ácido cítrico – 30 segundos

D – Dentina / P – Plástico

Os espécimes foram colocados em recipientes, os quais possuíam 24 compartimentos de 1,6 cm de diâmetro (Well Dishes, produto # 3542, Coastar Corp., Cambridge, MA). Nesses compartimentos foi aplicado 1 ml de MEM com FBS, agora suplementado com glutamina e penicilina/estreptomicina – meio de cultura completo (Gibco Laboratories).

Culturas de fibroblastos L 929 foram mantidas e passadas a cada 3 dias em frascos de 25 cm², em meio de cultura completo. Após a confluência celular, foi aplicado 1 ml da solução de tripsina/EDTA no interior dos frascos, os quais foram mantidos por 4 minutos em incubadora à 37°C/umidade 95% e 5% CO₂. As células em cada frasco de 25 cm² foram contadas em microscopia de luz invertida e finalmente aplicadas sobre cada disco de dentina em número de aproximadamente 10.000 células/cm². Permitiu-se que as células crescessem 1 ml de meio de cultura completo pelo período de 24 e 48 horas em estufa a 37°C, 95% de umidade/5% CO₂.

Num outro recipiente, foi aplicado o mesmo número de células em 12 laminulas de vidro de 1,2 cm de diâmetro, as quais foram previamente esterilizadas e posicionadas em 12 dos 24 compartimentos. Em 6 deles, as células foram mantidas em crescimento por 24 horas, enquanto nos outros 6 compartimentos elas foram cultivadas por 48 horas. Esses compartimentos foram usados como Grupos Controle, onde pôde-se comparar o crescimento e morfologia celular sobre os substratos dentinário (Grupos Experimentais) e/ou plástico (Controles).

Decorridos os períodos de 24 e 48 horas da aplicação das células sobre os substratos dentinário ou plástico, o meio de cultura foi cuidadosamente removido dos compartimentos e 1 ml do corante vital fluorescein diacetato (FDA, Vector Laboratories, Burlingame, CA) dissolvido em PBS (0,02 mg/ml) foi aplicado em cada compartimento e mantido em estufa a 37°C por 10 minutos. As células vitais apresentaram coloração verde em razão da ação do FDA. Assim, foi possível contar o número de células pelo uso de um retículo ocular (Leitz Wetzlar Germany – Periplan GF 12.5) adaptado a um microscópio de luz invertida, com aplicação de luz ultravioleta (Leitz-Germany). A contagem celular foi realizada por meio da seleção de 8 campos escolhidos aleatoriamente sobre a superfície dos discos de dentina ou plástico. As fotomicrografias foram obtidas imediatamente após a contagem celular com o microscópio OXIOSKOP para microscopia de luz e contraste de fase, no qual estava adaptado uma câmara fotográfica MC 100 (Leitz, Germany).

As células em cultura sobre os discos de dentina ou plástico foram também avaliadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) após fixação dos espécimes em glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Sciences – EMP, Fort Washington, PE, Lote #971218) em tampão de Sorensen, e pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% (Electron Microscopy Sciences, EMS – lote # 971218, FT. Washington, PA). Posteriormente à desidratação dos espécimes em trocas ascendentes de ethanol (30% – 100%), foram realizadas 3 trocas de 20 minutos cada de Hexamethyldisilane (HMDS, Sigma). Os espécimes foram colocados no dissecador “overnight”, montados em plataformas de alumínio (EMS, FT. Washington, PA), metalizados com ouro e examinados em microscópio AMRAY Scanning E. M., Model 1000B (AMRAY, Cambridge, MA).

Os grupos foram submetidos a comparação pela análise estatística de ANOVA e PLSD de Fisher com $p < 0,05$ (Stat View 4.5, Abacus Concepts Inc., CA, USA).

Resultado e discussão

Quando os discos de dentina condicionados com ácido cítrico a 50% pelo período de 30 segundos foram avaliados, pôde-se observar que praticamente toda a smear layer havia sido removida. Os túbulos dentinários apresentavam-se desobstruídos, com diâmetro interno aumentado provavelmente pela ausência da dentina peritubular (intratubular), e

com rede de fibras colágenas expostas. Por outro lado, os discos de dentina tratados com EDTA 0,5 M por 2 minutos, apresentavam restos de smear layer sobre sua superfície e no interior dos túbulos dentinários; em algumas regiões, grande volume daquele material amorfo recobria ampla quantidade de túbulos dentinários (Figura 1 A/B). Naqueles espécimes pertencentes tanto aos Grupos Experimentais quanto aos Controles, e que foram avaliados em microscopia de luz invertida (luz ultravioleta) e contraste de fase, pôde-se observar que as células sobreviveram em ambos os tempos de análise (24 e 48 hs) sobre os discos de dentina e sobre o substrato plástico. Pela contagem celular, foi possível determinar que as células aumentaram em número entre os períodos de tempo avaliados, caracterizando que ambos os substratos dentinários, submetidos a tratamentos diferentes, permitiram a multiplicação celular. Ficou claro que o substrato que permitiu maior crescimento celular foi o dentinário condicionado com ácido cítrico por 30 segundos, seguido pelo substrato plástico e finalmente o substrato dentinário tratado com EDTA. A relação entre o número médio de células L 929 presentes sobre dentina e plástico e os variados grupos avaliados pode ser observada no Gráfico 1. Foi possível ainda determinar que, para todos os grupos estudados, as células exibiam características alongadas, ou algumas vezes estreladas (Figuras 2 e 3). Para os Grupos Experimentais, as células limitaram sua presença e crescimento, apenas sobre dentina, não sobre esmalte. A distribuição celular não foi uniforme, e grupos de células pareciam se acumular em determinados locais da dentina. Para os Grupos Controle, um maior número de células sempre foi observado nas bordas dos compartimentos onde as células foram aplicadas. Um menor número de células esparsas estava presente no centro do compartimento.

Os espécimes dos grupos experimentais que foram avaliados em MEV confirmaram as características morfológicas de células fusiformes ou estreladas, observadas sob microscopia comum (Figura 4A), tanto para os Grupos Experimentais quanto para o Grupo Controle. Numerosos e finos prolongamentos citoplasmáticos, os quais se originavam da membrana das células L 929, pareciam aderi-las aos substrato de cultivo (Figura 4B). Células de morfologia arredondada caracterizaram o processo de divisão celular.

A avaliação estatística de ANOVA demonstrou que ocorreu significativa diferença no número de células presentes sobre os discos de dentina, para todos os Grupos Experimentais, onde houve variação no tratamento da dentina, bem como entre os períodos de observação ($p < 0,05$). A mesma diferença significativa entre os Grupos Experimentais e entre os Experimentais e Controles também pôde ser observada pela análise de

Fisher ($p < 0,05$). Todavia, não houve diferença significativa no número de células presentes sobre os discos de dentina entre os grupos 1 e 4.

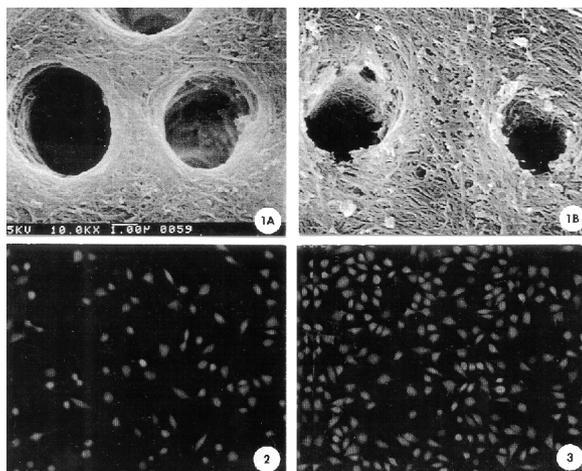
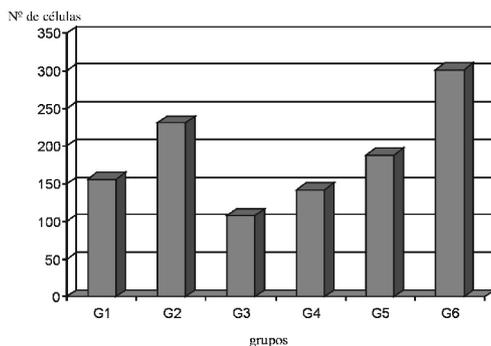


FIGURA 1 A - Disco de dentina condicionado com ácido cítrico a 50% pelo período de 30 segundos. Note a presença das fibras colágenas expostas e ausência de smear layer. B - Disco de dentina tratado com EDTA 0,5 M por 2 minutos. Presença de smear layer sobre a superfície dentinária e no interior dos túbulos. MEV, magnificação original x 10.0 KX.

FIGURA 2 - Grupo 4 - Pode-se observar distribuição não homogênea de células L 929 sobre o substrato dentinário. Detalhe de uma área sobre dentina, onde as células estão presentes, contornando a embocadura dos túbulos dentinários. Microscopia de Contraste de Fase com Luz ultravioleta, 320x.

FIGURA 3 - Grupo 6 - Maior número de células estão presentes sobre a dentina quando comparado com a Figura 2, apesar de a distribuição celular ainda não ocorrer de forma homogênea. Observam-se as características fusiformes ou estreladas das células L 929 e que elas não estão confluentes neste período de avaliação. Microscopia de Contraste de Fase com Luz ultravioleta, 400x.

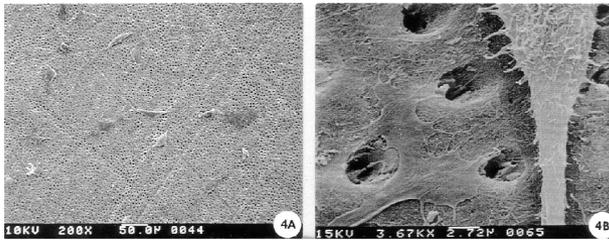


FIGURA 4 A – Grupo 3 – Características morfológicas específicas das células L 929, com seu citoplasma e processos citoplasmáticos como que aderindo as células ao substrato dentinário. MEV, magnificação original x 200x. B – Note os numerosos prolongamentos originados da membrana da célula L 929, os quais parecem fixá-la ao substrato dentinário. MEV, magnificação original x 3.67 KX.

Gráfico 1 – Número de células presentes sobre o substrato dentinário ou plástico de acordo com os variados grupos experimentais de controle

Os espécimes pertencentes aos Grupos Experimentais e Controle demonstraram que a dentina permitiu a multiplicação celular sobre sua superfície, semelhante ao que foi observado para o substrato plástico. Todavia, o número de células presentes sobre os discos de dentina condicionados com ácido cítrico foi superior àqueles tratados com EDTA ou o substrato plástico. Talvez, a persistência de restos de smear layer nos Grupos 3 e 4 possa ter interferido na multiplicação e adesão celular à dentina. Tem sido demonstrado que a smear layer parece exibir composição do tecido a partir do qual ela foi originada.²⁰ Normalmente, após corte de dentina sadia, como realizado no presente trabalho, a smear layer pode apresentar restos de colágeno e trivalente fosfato em hidroxapatita.¹⁸ Por outro lado, estudos demonstraram que a dentina também possui fatores de crescimento em sua composição, tais com “transforming growth factors” (TGFs) a super-família das “bone morphogenetic proteins” (BMPs, principalmente BMP₁ e BMP₄), “insulin-like growth factors” (IGF), “fibroblast growth factors” (FGFs), além de outras proteínas e glicosaminoglicanos, os quais parecem participar do processo de reparação do complexo dentina-polpa.^{11, 14} Essas proteínas da dentina parecem ser solubilizadas por substâncias ácidas de origem bacteriana durante a evolução de lesões de cárie, e então interagem com receptores de membrana das células pulpares.^{2, 6} Algumas dessas proteínas da dentina, fixadas e potencializadas por determinados componentes protéicos da matriz extracelular da polpa, são notáveis fatores mitogênicos sobre

variadas células de origem mesodérmica ou neurodérmica, dentre elas os fibroblastos.^{10, 17} Ainda, células mesenquimais indiferenciadas presentes no tecido pulpar podem ser estimuladas, por mecanismos específicos, a se diferenciar, migrar, alongar, além de sintetizar e depositar matriz dentinária após agressão pulpar e durante o processo de dentinogênese reparadora, cura e reparação tecidual.^{10, 17} Dessa maneira, podemos especular que o condicionamento ácido realizado sobre os discos de dentina humana, no presente trabalho, pode ter liberado algumas dessas proteínas metabolicamente ativas, as quais compunham parte do tecido dentinário. Essas proteínas, por sua vez, poderiam interagir com receptores específicos da membrana celular dos fibroblastos L 929, estimulando-os a se multiplicar mais rapidamente do que observado para os casos em que as células foram cultivadas sobre plástico. Todavia, nos Grupos 3 e 4, onde os discos de dentina foram condicionados com EDTA, o número de células foi inferior aos Grupos 1, 2, 5 e 6. Talvez isso possa ter ocorrido em razão da persistência de restos de smear layer sobre a superfície dentinária e ao baixo pKa do EDTA, o qual pode ter provocado menor liberação das proteínas ativas da dentina. Assim, além desse tecido amorfo presente sobre a dentina possivelmente obstruir a liberação de fatores de crescimento, poderia ainda interferir no processo de adesão das células à superfície dentinária; isso porque a smear layer se dissolve com o tempo, e conseqüentemente levaria consigo as células que estavam aderidas a ela. Alguns trabalhos de pesquisa têm extraído componentes não colagênicos da dentina utilizando-se o EDTA, e essas proteínas parecem ter atividade sobre a polarização dos odontoblastos e sua diferenciação funcional.^{1, 16} Pré-incubação dos componentes de dentina solúveis em EDTA com um anticorpo monoclonal bloqueador da atividade das TGF β levou à inibição de sua atividade biológica.¹⁵ Talvez, maior concentração de EDTA ou extensão do tempo de condicionamento dos discos de dentina possam remover mais smear layer, descalcificar dentina em maior profundidade e, assim, liberar mais fatores de crescimento e outros componentes protéicos da dentina solúveis em EDTA. Por outro lado, nos espécimes pertencentes aos Grupos 5 e 6 foram observadas notável remoção da smear layer e profunda descalcificação do tecido dentinário, mecanismo este que pode ter contribuído para a liberação de grande quantidade de componentes protéicos metabolicamente ativos. Essas proteínas livres podem ter interagido com receptores de membrana das células L 929. Dessa maneira, a proliferação celular local foi estimulada, resultando no maior número de células presentes sobre os discos de dentina nos dois períodos de avaliação, compa-

rando-se com os demais grupos estudados. Assim, parece que ambos os tratamentos de dentina permitem a sobrevivência e proliferação celular sobre este substrato. A aplicação do ácido cítrico, todavia, além de promover limpeza superficial da dentina superior ao EDTA, permite maior multiplicação celular sobre os discos de dentina humana. Apesar disso, a distribuição das células sobre a dentina não foi homogênea, o que poderia dificultar a completa confluência celular sobre aquele substrato específico. Porém, este problema está sendo solucionado pela manutenção dos discos de dentina sob constante agitação durante o período de aplicação dos ácidos. Quando a morfologia celular foi avaliada, pôde-se notar que as células L 929 exibiam característica fusiforme e achatada, com finos prolongamentos originados a partir da membrana celular, como que aderindo as células ao substrato. Essas características morfológicas associadas à manutenção da aderência celular foram observadas tanto para as células cultivadas sobre dentina quanto sobre plástico. Isso indica que ambos os substratos foram adequados à multiplicação celular. Semelhante morfologia celular e mecanismo de aderência de células ao substrato foi demonstrado por Schmalz & Schweikl,¹² quando os autores cultivaram fibroblastos L 929 sobre plástico e discos de dentina obtidos de bovinos. Dessa maneira, pode-se especular que o cultivo de outras linhagens de células sobre discos de dentina humana, tais como células odontoblastóides, pode ser possível, aproximando os testes de citotoxicidade dos materiais odontológicos, *in vitro*, das situações clínicas. Isso porque as células cultivadas sobre dentina poderão simular uma monocamada celular, semelhante à camada odontoblastica. Todavia, novos trabalhos de pesquisa se fazem necessários para avaliar a capacidade de células odontoblastóides, como aquelas recém-clonadas por Hanks et al.,^{4, 5} se multiplicar sobre discos de dentina humana e exercer a função de síntese e secreção de proteínas específicas da dentina, quando estimuladas para esta função.

Agradecimento

Os autores agradecem à Profa. Dra. Josimeri Hebling (Dep. Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP, SP), pelo auxílio na redação e análise estatística do presente trabalho, e ao Sr. Chris A. Edwards (Dep. of Anatomy and Cell Biology, University of Michigan-Medical School), pelo apoio técnico durante a obtenção das

fotomicrografias em MEV. O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, uma entidade do governo brasileiro voltada ao desenvolvimento científico e tecnológico, e NIDCR Research Grant # DE 09296.

COSTA, C. A. de S., HANKS, C. T. Culture of L 929 fibroblasts on human dentin discs. Evaluation by contrast phase microscopy and SEM. Rev. Odontol. UNESP (São Paulo), v.28, n.2, p.251-262, 1999.

- **ABSTRACT:** An in vitro pulp device (IVPD) has been developed to carry out in vitro studies concerning the cytotoxic effects of dental materials. This IVPD has allowed that different cell lines can be plated on pulpal surface of dentin discs rather than on the bottom of its pulpal compartment. Consequently, the aim of this preliminary study was to evaluate the conditions in which a fibroblast cell line (L 929) can grow on human dentin discs previously conditioned with different acidic agents. This is in order to determine whether a reproducible cell number can be maintained on dentinal substrate. In this way, 10.000 cells/cm² were allowed growing for 24 or 48 hours on plastic (Control Group) or dentin discs conditioned with either 50% citric acid- 30 seconds or EDTA 0.5M- 120 seconds (Experimental Groups). Following application of fluorescein diacetate (FDA) on the cells, they were counted under Phase Contrast Microscope. Cell morphology was assessed by SEM. It was observed that L 929 fibroblasts were able to survive and multiply on human dentin discs as well as on plastic. The cells showed similar morphology for either substrate. Therefore, the dentin discs treated with 50% citric acid showed higher number of cells on their surfaces than dentin discs treated with EDTA or plated on plastic substrate (Control Groups) for both time of evaluation. It was confirmed by ANOVA and Fisher's PLSD statistical analysis.
- **KEYWORDS:** Dentin; fibroblasts; acid etching dental.

Referências bibliográficas

- 1 BEGUE-KIRN, C. et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factors b1 (TGFβ1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) on the differentiation of odontoblast in vitro. Int. J. Dev. Biol., v.36, p.491-503, 1992.
- 2 FINKELMAN, R. D. et al. Quantitation of growth factors IGF-1, SGF/IGF-2 and TGF-B in human dentin. J. Bone Miner. Res., v.5, p.717-23, 1990.

- 3 HANKS, C. T. et al. Cytotoxicity of dental composites and others materials in a new in vitro device. *J. Oral Pathol.*, v.17, p.396-403, 1988.
- 4 _____. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Conn. Tiss. Res.*, v.37, p.233-49, 1998.
- 5 _____. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur. J. Oral Sci.*, v.106, p.261-67, 1998.
- 6 LESOT, H. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative process. *Cell Mat.*, v.3, p.201-17, 1993.
- 7 OUTHWAITE, W. C., LIVINGSTON, M. J., PASHLEY, D. H. Effects of changes in surface area, thickness, temperature and post-extraction time on human dentine permeability. *Arch. Oral Biol.*, v.21, p.599-603, 1976.
- 8 OUTHWAITE, W. C., MCKENZIE, D. M., PASHLEY, D. H. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J. Dent. Res.*, v.53, p.1503, 1974.
- 9 PASHLEY, D. H., LIVINGSTON, M. J. Effect of molecular size on permeability coefficients in human dentin. *Arch. Oral Biol.*, v.23, p.391-95, 1978
- 10 RUCH, J. V., LESOT, H., BEGUE-KIRN, C. Odontoblast differentiation. *Int. J. Dent. Biol.*, v.39, p.51-68, 1995.
- 11 RUTHERFORD, R. B. et al. Induction of reparative dentin formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch. Oral Biol.*, v.38, p.571-76, 1994.
- 12 SCHMALZ, G., SCHWEIKL, H. Characterization of an "in vitro" dentin barrier test using a standard toxicant. *J. Endod.*, v.20, p.592-94, 1994.
- 13 SCHUSTER, G. S. et al. Biocompatibility of posterior restorative materials. *Calif. Dent. J.*, v.24, p.17-31, 1996.
- 14 SMITH, A. J. et al. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. *J. Biol. Buccale*, v.18, p.123-9, 1990.
- 15 TZIAFAS, D. Reparative dentinogenesis: a monograph on the dentinogenic potential of dental pulp. Universal Studio Press, 1997a. p.57-64.
- 16 _____. Reparative dentinogenesis: a monograph on the dentinogenic potential of dental pulp. Universal Studio Press, 1997b. p.65-83.
- 17 YOSHIBA, N. et al. Immunolocalization of the small proteoglycan decorin in human teeth. *Arch. Oral Biol.*, v.41, p.351-7, 1996.
- 18 WANG, J. D., HUME, W. R. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentin. *Int. End. J.*, v.21, p.17-26, 1988.
- 19 WATAHA, J. C., HANKS, C. T. Biocompatibility testing. What can we anticipate. *Dent. Mater.*, 1998.
- 20 WATANABE, I., SAIMI, Y., NAKABAYASHI, N. Effect of smear layer on bonding to ground dentin – Relationship between grinding condition and tensile bond strength. *J. Jpn. Dent. Mater.*, v.13, p.101-8, 1994.