

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE DE UM ADESIVO EXPERIMENTAL COM G-IEMA

Trabalho submetido por
Diogo de Carvalho Magalhães
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

novembro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE DE UM ADESIVO EXPERIMENTAL COM G-IEMA

Trabalho submetido por
Diogo de Carvalho Magalhães
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Mário Polido

e coorientado por
Prof. Doutora Joana Vasconcelos e Cruz
e por
Prof. Doutor Miguel Chaves Ferreira

novembro de 2023

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Doutor Mário Polido por todo o apoio, dedicação e disponibilidade ao longo de todo o projeto. Obrigado por tudo;

À minha coorientadora, Prof. Doutora Joana Cruz, pela confiança depositada em mim para contribuir para o seu projeto, e por toda a ajuda ao longo do ano;

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Miguel Ferreira, por me ter acolhido no laboratório e acompanhado durante toda esta etapa, sem si não teria sido possível;

Ao Prof. Doutor José Brito, que apesar das adversidades foi incansável no tratamento dos dados;

A toda a minha família, em especial aos meus pais, irmão, tio e avós, meus apoios e exemplos desde sempre, qualquer sucesso que tenha na vida vai ser sempre graças a vocês. Só espero um dia conseguir retribuir tudo o que fizeram por mim, por mais difícil que seja. Obrigado a todos, não podia pedir melhor;

À minha namorada, minha motivação diária e apoio incondicional. Obrigado por fazeres parte da minha vida, e me ajudares a ser quem sou hoje. Que continuemos a crescer juntos por muito tempo;

A todos aqueles que fizeram parte do meu percurso ao longo desta jornada, em especial aos meus amigos e amigas mais próximos, que felizmente são muitos para nomear, e que tornaram estes 5 anos inesquecíveis. Obrigado por tudo o que passámos juntos. Aos soldados, que continuemos a travar muitas batalhas. Ao Ricardo, que esteja sempre presente para “mais uma”. Ao meu parceiro de box, de aventuras, e de muito mais, que continuemos a criar muitas histórias juntos durante muitos anos;

À Egas Moniz School of Health and Science, *muy noble* academia, segunda casa durante os últimos 5 anos, e para sempre.

Resumo

Objetivo: Comparar a citotoxicidade de um adesivo experimental contendo G-IEMA com 2 adesivos comerciais, bem como o estudo dos monómeros que os constituem, tentando avaliar a viabilidade do dendrímero G-IEMA como possível substituto do Bis-GMA.

Métodos: Para a realização do estudo de citotoxicidade, foram criados 2 grupos experimentais, um com amostras polimerizadas e outro não polimerizadas, cada um com $n=12$. As amostras polimerizadas foram confeccionadas através da fotopolimerização de 100 μ L de cada adesivo e monómero, tendo sido depois introduzidos em 5mL de meio celular, durante 24 horas. Para as amostras não polimerizadas, os adesivos e monómeros foram diluídos em etanol a 250mg/mL, e a partir daí preparadas soluções stock em meio celular a 0,125mg/mL. Utilizando uma linha celular primária de células da polpa, foram realizados os ensaios de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e iodeto de propídio (PI), após 24 horas de contacto dos extratos preparados com as células, de modo a avaliar a atividade metabólica e a indução de apoptose, respetivamente. Numa tentativa de reproduzir com maior exatidão o ambiente biológico sobre o qual os adesivos atuam, o cultivo celular foi também realizado em discos de dentina, aos quais foi efetuado o procedimento clínico de aplicação dos adesivos, e posterior ensaio de PI, após 24 horas.

Resultados: Não foram verificadas diferenças significativas entre o adesivo experimental EM2 e os adesivos comerciais. O Bis-GMA apresentou valores significativamente superiores ao G-IEMA no que diz respeito à indução de apoptose, em ambos os tipos de tratamento ($p < 0,001$). Foi possível verificar a presença e marcação com iodeto de propídio de células da polpa nos discos de dentina. Não existiu correlação entre os ensaios de MTT e PI ($r = -0,041$; $p = 0,659$).

Conclusões: Nas condições testadas, o adesivo experimental provou não ser mais tóxico que os adesivos atualmente disponíveis no mercado, demonstrando que o G-IEMA é um possível substituto viável do Bis-GMA em sistemas adesivos, tendo adicionalmente apresentado valores inferiores de indução de apoptose. É possível cultivar com sucesso, nas Egas Moniz, células da polpa em discos de dentina. É necessária a criação de uma base de testes sistematizada para melhor avaliar os mecanismos de citotoxicidade.

Palavras-Chave: G-IEMA, adesivo universal, monómeros, citotoxicidade

Abstract

Objective: To compare the cytotoxicity of an experimental adhesive containing G-IEMA with 2 commercial adhesives, as well as the study of their monomers, to assess the viability of the G-IEMA dendrimer as a possible substitute for Bis-GMA.

Methods: To carry out the cytotoxicity study, 2 experimental groups were created, one with polymerized samples and the other non-polymerized, each with n=12. The polymerized samples were made by photopolymerizing 100µL of each adhesive and monomer, and then placing them in 5mL of cell medium for 24 hours. For the non-polymerized samples, the adhesives and monomers were diluted in ethanol at 250mg/mL, and from there stock solutions were prepared in cell medium at 0.125mg/mL. Using a primary cell line of pulp cells, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and propidium iodide (PI) assays were carried out after 24 hours of contact between the extracts and the cells, to assess metabolic activity and the induction of apoptosis, respectively. In an attempt to reproduce more accurately the biological environment on which the adhesives are used, cells were also seeded in dentin disks, and the adhesives were applied following clinical procedure, in order to perform the propidium iodide (PI) assay 24 hours later.

Results: No significant differences were found between the EM2 experimental adhesive and the commercial adhesives. Bis-GMA showed significantly higher values of apoptosis induction than G-IEMA, in both conditions ($p < 0.001$). It was possible to assess the presence and PI marking of pulp cells in the dentin disks. There was no correlation between the MTT and PI tests ($r = -0.041$; $p = 0.659$).

Conclusions: Under the conditions tested, the experimental adhesive proved to be no more toxic than the adhesives currently available on the market, demonstrating that G-IEMA is a viable substitute for Bis-GMA in adhesive systems, having also showed lower apoptosis induction. Pulp cells can be successfully seeded on dentin disks at Egas Moniz School of Health and Science. It is necessary to create a systematized test base to better evaluate cytotoxicity mechanisms.

Keywords: G-IEMA, universal adhesive, monomers, cytotoxicity

Índice

I. Introdução	15
1. Adesão aos substratos	15
1.1 Esmalte	16
1.2 Dentina	16
2. Técnicas Adesivas	17
2.1 Etch-and-Rinse	19
2.2 Self-Etch	21
3. Adesivos Universais	23
3.1 Composição	24
3.2 Limitações	26
4. Biocompatibilidade	27
4.1 Bis-GMA e derivados	28
4.2 Ensaio de citotoxicidade	29
5. Enquadramento	30
II. Objetivos do estudo	33
III. Hipóteses do estudo	33
IV. Materiais e Métodos	35
1. Amostra de estudo	35
1.1 Formulação do Adesivo Experimental/ G-IEMA	36
1.2 Preparação dos Extratos	36
1.3 Obtenção dos Discos de Dentina	38
2. Cultura celular	39
2.1 Linhas celulares	39
2.2 Descongelamento e incubação	40
3. Ensaio de citotoxicidade	41
3.1 MTT	41
3.2 Pi	43
3.3 Discos de dentina com Pi	44
3.4 Análise estatística	45
V. Resultados	47
1. Análise da atividade metabólica (MTT) e indução de apoptose (PI) em adesivos polimerizados e não polimerizados	47
1.1 MTT	47

1.2 <i>Pi</i>	49
2. Análise da atividade metabólica (MTT) e indução de apoptose (PI) em monómeros polimerizados e não polimerizados	50
2.1 <i>MTT</i>	51
2.2 <i>Pi</i>	52
3. Resultados do teste de <i>Pi</i> nos discos de dentina	54
VI. Discussão	57
VII. Conclusões	67
VIII. Relevância Clínica.....	67
IX. Perspetivas Futuras	69
X. Bibliografia.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema da diluição dos extratos não polimerizados.....	38
Figura 2. Esquema da preparação dos extratos com os adesivos e monómeros polimerizados	38
Figura 3. Imagem microscópica das células da polpa	39
Figura 4. Fotografia das placas de 96 com a cultura celular	41
Figura 5. Fotografia da câmara de fluxo laminar	41
Figura 6. Imagem representativa da distribuição dos extratos na placa com a cultura celular	42
Figura 7. Esquema representativo do teste de MTT	43
Figura 8. Esquema representativo do teste com Pi.....	44
Figura 9. Esquema representativo de aplicação dos adesivos nos discos de dentina	45

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição dos adesivos em estudo (Tabela adaptada de Vasconcelos e Cruz et al., 2022)	36
Tabela 2. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da atividade metabólica (MTT) dos adesivos.....	48
Tabela 3. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da indução de apoptose (Pi) dos adesivos.....	49
Tabela 4. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da atividade metabólica (MTT) dos monómeros.....	51
Tabela 5. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da indução de apoptose (Pi) dos monómeros.....	52

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Atividade metabólica, em percentagem, dos diferentes adesivos. Foram verificadas diferenças significativas entre todos os adesivos estudados e o grupo de controlo, não se tendo verificado diferenças entre o adesivo experimental (EM2) e os adesivos comerciais, para nenhuma forma de tratamento.	48
Gráfico 2. Valores de indução de apoptose, em percentagem, dos diferentes adesivos. Foram verificadas diferenças significativas entre todos os adesivos estudados e o grupo de controlo, não se tendo verificado diferenças entre o adesivo experimental (EM2) e os adesivos comerciais, para nenhuma forma de tratamento.	50
Gráfico 3. Atividade metabólica, em percentagem, dos diferentes monómeros. Foram verificadas diferenças significativas entre os vários adesivos, para ambas as formas de tratamento.	52
Gráfico 4. Valores de indução de apoptose, em percentagem, dos diferentes monómeros. Foram verificadas diferenças significativas entre os vários adesivos, para ambas as formas de tratamento.	53
Gráfico 5. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi após aplicação do adesivo EM2, à esquerda, e respetivo controlo, à direita. É possível observar-se, para ambos os casos, a presença de células da polpa nos discos de dentina, no gate denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no gate denominado “PI”.	54
Gráfico 6. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi após aplicação do adesivo Scotchbond, à esquerda, e respetivo controlo, à direita. É possível observar-se, para ambos os casos, a presença de células da polpa nos discos de dentina, no gate denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no gate denominado “PI”.	54
Gráfico 7. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi após aplicação do adesivo Futurabond, à esquerda, e respetivo controlo, à direita. É possível observar-se, para ambos os casos, a presença de células da polpa nos discos de dentina, no gate denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no gate denominado “PI”.	55
Gráfico 8. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi do grupo de controlo negativo. É possível observar-se a presença de células da polpa nos discos de dentina, no gate denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no gate denominado “PI”. ...	55

Lista de Abreviaturas

4-META - 4-Metacriloxietil-Trimelitato-Anidrido

10-MDP - 10--Metacriloiloxidecil Dihidrogeno Fosfato

ANOVA - Análise de Variância

Bis-GMA - Dimetacrilato de Bisfenol A-glicidil

BPA - Bisfenol A

BDA - Etil-4- Dimetilaminobenzoato

CO₂ - Dióxido de Carbono

CQ - Canforoquinona

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

FBS - Soro Fetal de Bovino

G-IEMA - G(2)-Metacrilato de 2-isocianoetilo

GPDM - Glicerol-Fosfato dimetacrilato

HEMA - Hidroxietil Metacrilato

HPDPI - Difeniliodoniumhexafluorofosfato

ISO - International Organization for Standardization

KMO - Teste de Kaiser-Meyer-Olkin

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

n - Replicados

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão Fosfato-Salino

PI - Iodeto de Propídio

rpm - Rotações Por Minuto

SPSS - Statistical Package for Social Science

TEGDMA - Dimetacrilato de Trietilenoglicol

UDMA - Dimetacrilato de Uretano

I. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cárie dentária é a doença não transmissível mais comum em todo o mundo, afetando cerca de 2,5 mil milhões de pessoas de todas as idades (WHO, 2022). Apesar dos crescentes esforços ao nível da prevenção, o tratamento da cárie é e continuará a ser uma grande parte do dia a dia clínico em Medicina Dentária. O tratamento passa pela remoção do tecido cariado, e a sua substituição pelos materiais que melhor reproduzam a estrutura do esmalte e/ou dentina perdidos (Cheng et al., 2022).

Durante mais de 150 anos, o material de eleição foi a amálgama, devido à sua durabilidade e efeito antibacteriano (Plasmans et al., 1998; Beyth et al., 2007). No entanto, devido à libertação de mercúrio, principal constituinte da amálgama dentária, e aos seus efeitos tóxicos, esta deixou de ser uma opção restauradora viável, sendo o seu uso desaconselhado após a Convenção de Minamata sobre redução do uso de mercúrio, em 2013 (Coulter, 2016).

Posto isto, atualmente a escolha recai sobre os materiais restauradores à base de resina composta (Pfeifer, 2017), que além de favorecerem a estética devido às suas propriedades óticas, não necessitam de um desgaste tão agressivo da estrutura dentária para atingirem resultados favoráveis, indo assim ao encontro da premissa da dentisteria minimamente invasiva (FDI World Dental Federation, 2017; Swift et al., 1995).

Para garantir uma adesão eficaz, com o mínimo desgaste possível, é necessária uma substância que interaja com o substrato e com o material restaurador, de tal forma que crie ligações o mais fortes possível de modo a promover uma adesão competente e duradoura: é aí que entram os sistemas adesivos (Yoshihara et al., 2013).

1. Adesão aos substratos

O conceito fundamental da adesão baseia-se na impregnação de monómeros resinosos na estrutura do tecido dentário, que interagem com o substrato de modo a criar fenómenos de microretenção (Van Meerbeek et al., 2001).

No entanto, o dente é composto por diferentes substratos, com diferentes características que têm de ser tidas em consideração no processo de adesão, apresentando cada um os seus desafios. É por isso importante conhecer a composição e morfologia destes tecidos, para um melhor entendimento do funcionamento dos sistemas adesivos (Sezinando, 2014).

1.1 Esmalte

O esmalte é o substrato mais externo do dente, servindo como uma camada protetora para as restantes estruturas. É o tecido mais duro do corpo humano, característica importante, uma vez que o dente está sujeito a rigorosas interações mecânicas e químicas na cavidade oral (Beniash et al., 2019).

Tem uma estrutura muito mineralizada, sendo composto, em peso, por 95% de matéria inorgânica, a hidroxiapatite, 1% de matriz orgânica, e 4% de água (Fincham et al., 1999). A sua elevada densidade e orientação altamente organizada dos prismas de hidroxiapatite, conferem-lhe uma estrutura rígida e cristalina, vulnerável à desmineralização e remineralização, fatores importantes no que diz respeito à adesão dentária (Lawn et al., 2010).

Devido a estas propriedades mecânicas favoráveis, e à simplicidade da sua composição, a adesão ao esmalte pode ser considerada previsível na maioria dos procedimentos restauradores adesivos (Perdigão, 2020).

1.2 Dentina

A dentina, por outro lado, apresenta uma organização um pouco mais complexa. Constituída, em peso, apenas por 70% de matéria inorgânica, sendo o restante matriz orgânica e água, 20%, a sua composição é formada principalmente por fibras de colagénio tipo I, penetradas por um vasto labirinto tubular com processos odontoblásticos (Tjäderhane, 2015). Estes odontoblastos são os responsáveis por produzir o colagénio, que compõem tanto o substrato dos túbulos como da matéria circundante, a dentina peritubular (Carvalho et al., 2009).

Os túbulos dentinários estendem-se desde a junção amelo-dentinária até à polpa, tendo, no entanto, características diferentes: junto da polpa a densidade tubular é maior, e consequentemente os túbulos encontram-se mais juntos. Para além disso apresentam também uma maior quantidade de água. À medida que se aproximam da junção amelo-dentinária, a quantidade de água diminui, bem como o número de túbulos, aumentando naturalmente a distância entre eles (Garberoglio & Brännström, 1976). Esta heterogeneidade característica da composição da dentina é um dos fatores que dificulta a adesão a este substrato (Van Meerbeek, 1992).

Para além disso, a dentina é um tecido intrinsecamente húmido e difícil de secar, ao contrário do esmalte (Perdigão, 2002). A hidratação é feita através dos túbulos, que estão em contacto direto com a polpa (Pashley, 1989). Assim, tanto os túbulos como a dentina intertubular são permeabilizados por fluido, sujeito a uma pressão constante por parte da polpa (Swift et al., 1995).

Esta intensa dinâmica cria elevadas resistências à união, e pode ser responsável por fugas marginais, tornando assim a adesão à dentina um desafio mais complexo do que a adesão ao esmalte (Perdigão, 2002).

2. Técnicas Adesivas

A história dos sistemas adesivos começou há mais de 70 anos, com a aplicação para a patente do primeiro adesivo dentário, por parte do químico suíço Dr. Hagger (Hagger, 1951). Desde então, verificou-se uma grande evolução nesta área, com incessantes esforços por parte da comunidade científica em alcançar aquele que seria o “adesivo ideal”, ou seja, um sistema adesivo que adira eficazmente tanto ao esmalte como à dentina, com um bom selamento marginal, que proporcione restaurações duradouras e resistência às recidivas de cárie (Perdigão, 2020).

Embora tenham sido alcançados significativos progressos, os adesivos atuais ainda têm algumas limitações, no entanto, podemos afirmar que os adesivos disponíveis obtêm bons resultados tanto em laboratório como em termos clínicos (Peumans et al., 2005; Loguercio et al., 2007; Van Dijken, 2010). Tal é possível em grande parte devido ao

desenvolvimento de novas técnicas e alterações na conformação química (Moszner et al., 2005; Van Landuyt et al., 2007).

Em termos de componentes, todos os sistemas adesivos têm três constituintes principais: o ácido, o *primer* e o *bond*/adesivo.

O ácido, normalmente ortofosfórico entre 30% a 40%, tem como papel a desmineralização da estrutura dentária e remoção dos detritos presentes na superfície (*smear layer*), o que leva à criação de microporosidades no esmalte (Buonocore et al., 1968), ao passo que na dentina expõe as fibras de colagénio e os túbulos dentários (Swift et al., 1995).

O *primer* é uma solução composta por monómeros hidrofílicos, dissolvidos num solvente orgânico, tal como o álcool, acetona, ou água que aumenta a molhabilidade e cria ligações químicas com a estrutura do esmalte, facilitando também a difusão do adesivo pela estrutura desmineralizada. Para além disso, impede a rede de colagénio de colapsar devido às suas características hidrofílicas, enquanto ajuda a eliminar a água residual por intermédio dos solventes orgânicos, como o álcool, criando assim um ambiente favorável para receber o *bond*/adesivo (Kanca, 1992; Pashley et al., 2011).

Por fim, o *bond*/adesivo, é uma resina hidrofóbica de baixa viscosidade, e é responsável por criar uma ligação estável e duradoura, interagindo com o *primer* e o material restaurador (Perdigão, 2020; Sezinando et al., 2015).

Para além das características do esmalte e da dentina previamente mencionadas, existe ainda um outro fator a ter em conta quando se fala de adesão dentária. Aquando da instrumentação do substrato dentário com instrumentos rotatórios ou abrasivos, seja em esmalte ou dentina, os detritos resultantes tendem a acumular-se à superfície, formando uma fina camada, a *smear layer* (Eick et al., 1970). Esta é composta principalmente por fragmentos de hidroxiapatite e dos instrumentos rotatórios, colagénio desnaturado, e por vezes microrganismos e saliva (Pashley, 1984), no entanto, a sua composição varia consoante a profundidade, uma vez que a estrutura da dentina também altera a sua conformação à medida que se aproxima da polpa (Pashley, 1989).

Para além desta camada superficial, parte dos detritos penetram até vários micrómetros para dentro dos túbulos dentinários, formando assim os chamados *smear plugs* (Marshall et al., 1997). Tanto a *smear layer* como os *smear plugs* atuam como tampões podendo diminuir a permeabilidade até 86% (Pashley et al., 1978).

Este facto constitui um problema no que diz respeito à adesão, uma vez que cria uma barreira que dificulta a difusão dos sistemas adesivos. Como tal, estes interagem de diferentes formas com a *smear layer*, numa tentativa de contornar essa situação. Dependendo da estratégia usada, esta pode ser removida, total ou parcialmente, ou incorporada no substrato, fazendo parte do mecanismo de adesão (Van Meerbeek et al., 2003).

A forma como os sistemas adesivos atuais combinam estes componentes bem como a sua interação com a *smear layer*, dita a sua classificação em dois tipos de sistemas adesivos: *Etch-and-Rinse* e *Self-Etch* (Van Meerbeek et al., 2003).

2.1 *Etch-and-Rinse*

O conceito base do sistema *etch-and-rinse* surgiu em 1955, quando o Dr. Michael Buonocore provou conclusivamente que o tratamento do esmalte com ácido, neste caso ortofosfórico a 85%, melhorava significativamente a força de união ao substrato (Buonocore, 1955).

Os sistemas *etch-and-rinse* convencionais preconizam 3 passos na sua aplicação, o condicionamento com ácido (seguido de lavagem com água e secagem com ar), a aplicação do *primer* (apenas seco com ar) e por fim do *bond*/adesivo. Numa tentativa de simplificar os processos, foi criada uma abordagem de 2 passos, em que o *primer* e o *bond*/adesivo são aplicados simultaneamente, sendo sempre precedidos da aplicação do ácido em separado (Van Meerbeek, 2003).

A atuação do ácido no esmalte, para além de eliminar a *smear layer*, leva à desmineralização dos cristais de hidroxiapatite, criando microporosidades à superfície. A impregnação do *primer* e do *bond*/adesivo nos espaços criados pelo ácido, e posterior

polimerização, cria uma interligação micromecânica entre o adesivo e o substrato dentário, que promove eficazmente a retenção (Buonocore et al., 1968).

Sendo o esmalte muito mineralizado, mesmo após o condicionamento ácido continua com uma estrutura estável que permite a fácil difusão dos monómeros resinosos, por capilaridade, para as porosidades criadas. Após a polimerização, estes formam, em conjunto com o substrato, os denominados *resin tags*, responsáveis pela forte união entre a resina e o esmalte (Sezinando, 2014). Esta técnica provou-se extremamente eficaz, sendo ainda hoje considerada o *gold standard* no que diz respeito à adesão ao esmalte (Perdigão, 2007).

Por outro lado, devido à composição e conformação da dentina, a aplicação da técnica *etch-and-rinse* neste substrato é mais complexa e sensível (Rosa et al., 2015).

Uma vez que a matéria inorgânica representa apenas 45% da composição da dentina, a ação desmineralizante do ácido vai remover os *smear plugs* e deixar exposta a rede de colagénio, contando apenas com uma quantidade residual de hidroxiapatite (Swift et al., 1995). Sem o apoio estrutural da hidroxiapatite, a água presente na dentina, bem como a que é adicionada para remover o ácido da superfície, são essenciais para impedir o colapso das fibras de colagénio, sendo por isso necessário extremo cuidado na secagem da dentina após remoção do ácido, sob pena da rede de colagénio colapsar e impedir a infiltração do *primer* e do *bond*/adesivo (Kanca, 1992).

A posterior polimerização dos monómeros resinosos na matriz de colagénio cria uma camada que oferece retenção mecânica, essencial para o sucesso da adesão. Esta foi descrita pela primeira vez em 1982 por Nakabayashi et al., e apelidada de camada híbrida, sendo considerado o principal determinante do sucesso da adesão (Pashley et al., 2011).

Quanto aos monómeros que se difundem para os túbulos, estes formam, após a polimerização, os supramencionados *resin tags*, semelhantemente ao que acontece no esmalte, embora não tão eficazes, uma vez que a rede de colagénio está praticamente desprovida de hidroxiapatite após o condicionamento ácido (Van Meerbeek et al., 2003).

No entanto, estes adesivos simplificados apresentam uma reduzida capacidade de se infiltrarem na dentina desmineralizada, produzindo uma camada híbrida abaixo do expectável para uma adesão otimizada, principalmente comparando com os adesivos de 3 passos (Finger & Balkenhol, 1999).

Como já foi referido é essencial não desidratar o substrato dentinário após o condicionamento ácido, uma vez que a rede de colagénio está suportada pela água existente, colapsando caso esta seja removida. Por outro lado, também sabemos que um excesso de humidade impede a infiltração do adesivo e subsequente formação da camada híbrida, comprometendo o sucesso do procedimento (Miyazaki et al., 2014). Torna-se então crucial a obtenção de um grau de hidratação adequado da dentina para garantir um sistema adesivo eficaz, algo que em termos clínicos é bastante difícil de alcançar, tornando o sucesso do uso da técnica *etch-and-rinse* dependente da capacidade do operador (Martins et al., 2008; Choi et al., 2017).

Apesar da técnica *etch-and-rinse* três passos ser considerada como o gold-standard na adesão dentária (Perdigão, 2007), apresenta ainda assim algumas limitações, principalmente no que diz respeito à adesão à dentina, nomeadamente devido à dificuldade de utilização (De Munck et al., 2005).

Nesse sentido, apesar da notável durabilidade clínica demonstrada pelos sistemas adesivos *etch-and-rinse*, continua a procura por materiais adesivos de natureza mais simplificada, caracterizados por um menor número de etapas e pela capacidade de autocondicionamento. (Breschi et al., 2008).

2.2 Self-Etch

Numa tentativa de contornar as dificuldades existentes na adesão à dentina, e simplificar ainda mais os processos, para que o sucesso da aplicação de adesivos não fosse tão dependente do operador, foi criado, há cerca de 25 anos, o conceito de *self-etch* (Van Meerbeek, 2003).

A grande inovação dos adesivos *self-etch* prende-se na remoção da aplicação do ácido ortofosfórico em separado, uma vez que os monómeros que constituem o *primer* são por

si só acídicos, condicionando e preparando o substrato simultaneamente (Van Meerbeek et al., 2011).

Assim, ao contrário do que acontece com os adesivos *etch-and-rinse*, a *smear layer* não é removida, mas incorporada no sistema adesivo, sendo uma das grandes vantagens desta técnica o facto de desmineralizar e infiltrar o substrato simultaneamente e consequentemente à mesma profundidade, garantindo uma difusão quase completa do adesivo (Tay & Pashley, 2001; Carvalho et al., 2005).

Os adesivos *self-etch* podem encontrar-se em sistemas de 2 passos, em que após a aplicação do *primer* acídico, o *bond*/adesivo é adicionado separadamente, ou em sistema *all-in-one*, em que todos os componentes estão misturados no mesmo recipiente, e são aplicados em apenas 1 passo (Sofan et al., 2017). Para além disso, consoante a sua acidez, podem ser classificados em *strong* quando o seu pH é inferior a 1, intermédio caso seja entre 1 e 2, e *mild*, caso tenha um pH igual ou superior a 2 (Van Meerbeek et al., 2011).

No que toca a adesão ao esmalte, nem mesmo os adesivos *self-etch* mais ácidos têm a capacidade de desmineralizar este substrato com a mesma eficácia do ácido ortofosfórico, fator preponderante no processo de adesão a este substrato (Erickson et al., 2009). Desse modo, as forças de adesão ao esmalte geradas pelos adesivos *etch-and-rinse* são superiores às dos *self-etch*, continuando a ser a técnica mais eficaz a aplicar (Perdigao et al., 2005; Lührs et al., 2008).

No contexto da adesão à dentina, os sistemas adesivos *self-etch* evidenciam uma conformidade com a morfologia e biologia inerentes a este tecido. O facto de preservarem uma quantidade substancial de hidroxiapatite, possibilita, ao contrário do que acontece quando se efetua o condicionamento ácido na dentina, em que existe pouca matéria inorgânica remanescente, o estabelecimento de ligações entre os monómeros funcionais presentes no adesivo e o substrato. Dessa maneira, a capacidade adesiva é reforçada. Para além disso, sem o condicionamento ácido, não é necessário lavar nem secar a dentina, resolvendo o problema do controlo da hidratação do substrato. Estes sistemas demonstram ser alternativas pertinentes e promissoras no que diz respeito à adesão a dentina. (Van Meerbeek et al., 2003; Van Meerbeek et al., 2011)

Não obstante, uma vez que a *smear layer* não é removida, os túbulos de dentina não ficam expostos, o que por um lado resulta numa maior dificuldade dos monómeros em infiltrar a dentina, o que consequentemente torna a camada híbrida menos espessa e os *resin tags* mais curtos (Hashimoto et al., 2004). Por outro lado, verifica-se uma redução da sensibilidade pós-operatória quando comparado com os adesivos *etch-and-rinse* (Unemori et al., 2004; Perdigão et al., 2003; Sancakli et al., 2014).

As falhas inerentes à escassa capacidade de difusão e consequente fraca camada híbrida, aliadas a uma polimerização incompleta, derivada da acidez dos monómeros, não podem ser desprezadas (Wang & Spencer, 2005).

Como tal, apesar de rentabilizarem tempo de trabalho ao clínico, reduzirem a sensibilidade pós-operatória e até constituírem uma boa alternativa no que diz respeito à adesão à dentina, os sistemas *self-etch* ainda podem ser otimizados, uma vez que a adesão à dentina continua a ser um desafio (De Munck et al., 2005), e no que diz respeito ao esmalte, os sistemas *etch-and-rinse* continuam a obter melhores resultados (Tjäderhane, 2015; Van Meerbeek et al., 2011).

3. Adesivos Universais

A procura por processos ainda mais simples, aliada às diferentes opiniões no que diz respeito à técnica mais eficaz nas diferentes situações clínicas, levaram à introdução no mercado de uma nova geração de sistemas adesivos: os adesivos universais (Van Meerbeek et al., 2020).

Embora uma definição oficial para o que constitui um adesivo universal ainda não esteja definida, a literatura caracteriza-o como um sistema adesivo de apenas um frasco, sem necessidade de mistura, que demonstra igual eficácia nas diversas estratégias de adesão aderindo de forma adequada a toda estrutura dentária, seja esmalte ou dentina, bem como a uma variedade de materiais utilizados em restaurações diretas e indiretas (Gary, 2015; Hayashi, 2020).

Assim, estes adesivos podem ser aplicados utilizando qualquer técnica, seja *etch-and-rinse* ou *self-etch*, dependendo da preferência do operador (Gary, 2015; Perdigão & Swift,

2015). Essa adaptabilidade proporciona a combinação das vantagens inerentes aos sistemas adesivos *etch-and-rinse* no que toca à aderência ao esmalte, com aquelas apresentadas pelos sistemas adesivos *self-etch* na adesão à dentina (Van Meerbeek et al., 2020).

Perante este cenário, diversos autores defendem que a abordagem mais precisa e eficaz para a utilização desse sistema recai na aplicação prévia de ácido ortofosfórico exclusivamente na superfície do esmalte, seguida da subsequente aplicação do adesivo em ambos os substratos - *selective enamel etching* (Cuevas-Suarez et al., 2019; Frankenberger et al., 2008; Da Rosa et al., 2015; Perdigão & Swift, 2015).

Deste modo, o esmalte é suficientemente desmineralizado para uma eficaz difusão dos monómeros resinosos, ao passo que na dentina, não havendo condicionamento ácido, os erros inerentes à lavagem e secagem são colmatados, para além de que a preservação da matéria inorgânica possibilita o estabelecimento de ligações químicas com os monómeros funcionais da dentina (Perdigão & Swift, 2015; Sofan et al., 2017).

Embora tenham uma composição semelhante aos adesivos *self-etch* de 1 passo, os adesivos universais necessitam de monómeros multifuncionais específicos, capazes de proporcionar tanto ligações químicas como mecânicas, para garantir o sucesso na adesão a todo o tipo de substratos (Gary, 2015).

3.1 Composição

Os adesivos universais necessitam de uma estrutura que lhes permita criar tanto ligações químicas como mecânicas, uma vez que contemplam o desafio acrescido de aderir a todo o tipo de substratos, tanto a materiais sintéticos como à estrutura viva do dente (Hayashi, 2020; Van Meerbeek et al., 2020).

Deste modo, esta classe de sistemas adesivos necessita de monómeros funcionais e reticuláveis, que interajam entre si para permitir uma relação favorável nas diversas circunstâncias clínicas, apresentando características hidrofílicas para manter a dentina hidratada, e ao mesmo tempo ser hidrofóbico o suficiente para proteger contra a hidrólise e absorção de água após a polimerização (Gary, 2015).

Podemos então distinguir dois tipos de monómeros, os de reticulação, ou “*cross-link*”, e os não reticuláveis.

Os funcionais, usualmente hidrofílicos, têm a capacidade de desmineralizar e criar ligações químicas ao esmalte e à dentina, possibilitando a infiltração dos restantes compostos e promovendo a adesão. 10--Metacriloiloxidecil Dihidrogeno Fosfato (10-MDP), 4--Metacriloietil-Trimelitato-Anidrido (4-META), Hidroxietil Metacrilato (HEMA) e Glicerol-Fosfato dimetacrilato (GPDM) são os monómeros desta categoria mais frequentemente usados (Dressano et al., 2020).

Por outro lado, os monómeros reticuláveis costumam ser hidrofóbicos, e apresentam melhores capacidades mecânicas que os funcionais, sendo a sua principal função o reforço da estabilidade e resistência mecânica dos adesivos. Os mais frequentemente utilizados são o Dimetacrilato de Bisfenol A-glicidil (Bis-GMA), o Dimetacrilato de Trietilenoglicol (TEGMA) e o Dimetacrilato de Uretano (UDMA) (Van Landuyt et al., 2007).

A utilização de monómeros tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, bem como a sua alta viscosidade, leva a que sejam necessários solventes, para permitir não só a sua mistura no frasco como uma difusão eficaz no substrato (Perdigão & Frankenberger, 2001; Van Landuyt et al., 2007). Para além disso, o solvente, aliado aos monómeros hidrofílicos, aumenta consideravelmente a molhabilidade do adesivo, e consequentemente a sua capacidade de adesão (Tay & Pashley, 2003).

A água, o álcool e a acetona são os solventes mais utilizados neste contexto. A presença de água é requisitada para efetuar a dissociação dos monómeros funcionais, conferindo-lhe um papel de destaque como componente frequente nos sistemas adesivos universais. Não obstante, o processo de evaporação da água revela-se bastante difícil, o que incita à necessidade de associação com o álcool ou a acetona a fim de facilitar a condução desse procedimento (Carvalho et al., 2012).

Antes da aplicação do material restaurador, os adesivos devem ser polimerizados, de modo a obter uma boa resistência mecânica e impedir o adelgaçamento da camada de adesivo com a aplicação do material restaurador (Yoshida & Greener, 1994). Para que ocorra polimerização, é necessário que os materiais dentários contenham iniciadores na sua composição. No caso dos sistemas adesivos isto ocorre através de um processo

fotoquímico, em que ondas de luz com frequências específicas (entre 380 nm a 480 nm- luz azul) ativam os iniciadores, neste caso foto-iniciadores, presentes no adesivo, dando-se a este processo o nome de fotopolimerização (Dressano et al., 2020). O fotoiniciador mais utilizado nos sistemas adesivos é a canforoquinona (CQ), com um intervalo de absorvância entre os 400nm e 500nm, após ser ativada pela luz azul, desencadeia a libertação de radicais livres e a consequente polimerização dos monómeros do adesivo (Neumann et al., 2005).

3.2 Limitações

Apesar dos comprovados benefícios da técnica simplificada dos adesivos universais atuais, existem ainda diversas limitações que contribuem para a degradação da interface entre o dente e a restauração, conduzindo ao aparecimento de cárie secundária (Muñoz et al., 2013; Sezinando, 2014).

Todos os adesivos universais contêm água, é indispensável para garantir a interação dos monómeros acídicos com o substrato. No entanto, tal implica uma quantidade aumentada de solventes e monómeros hidrofílicos residuais impregnados na camada adesiva (Yiu et al., 2005). Tal poderá levar a disrupção das ligações dos monómeros de reticulação (Paul et al., 1999) e diminuição do grau de conversão de polimerização (Cadenaro et al., 2005), afetando as forças de adesão e aumentando a permeabilidade da camada adesiva após a polimerização. Estes processos desencadeiam então a degradação hidrolítica dos polímeros e do colagénio, comprometendo o sucesso da restauração (Salz et al., 2005).

Por conseguinte, um dos passos críticos durante a aplicação de qualquer adesivo à base de água, incluindo os adesivos universais, é a eficaz evaporação do solvente após a aplicação do adesivo na dentina e no esmalte (Luque-Martinez et al., 2014).

Posto isto, várias têm sido as estratégias mencionadas para colmatar estas falhas, nomeadamente, adição duma camada resinosa hidrofóbica, dispêndio de mais tempo na secagem do adesivo ou maior prevenção contra a contaminação na aplicação do adesivo (Gary, 2015).

Outro dos problemas destes adesivos prende-se na citotoxicidade. Uma vez que entram em contato direto com os tecidos orais e atuam próximo do complexo pulpar, emerge a pertinência de examinar a biocompatibilidade dos adesivos dentários (Wawrzynkiewicz et al., 2020).

4. Biocompatibilidade

A inserção de um material no organismo cria uma interface, que necessita de estabilidade biológica e estrutural enquanto se encontrar em contacto com o mesmo. Facto que ocorre, como já vimos, com os sistemas adesivos. Caso o adesivo não penetre completamente a rede de colagénio, ou se se desadaptar devido à contração de polimerização, pode levar à entrada de fluidos através das fendas criadas, fenómeno denominado de microinfiltração, que pode não só afetar o sucesso da restauração, como permitir a migração de agentes patogénicos para a polpa, comprometendo a sua integridade (Anusavice et al., 2012).

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um biomaterial desempenhar a função pretendida em relação a uma terapia médica/dentária sem desencadear qualquer efeito indesejado, local ou sistémico, no recetor, produzindo a resposta celular ou tecidual benéfica mais apropriada para aquela situação específica, otimizando o desempenho clinicamente relevante dessa terapia (Williams, 2008).

Quando estamos perante um material com capacidade relativa (efeito relacionado com a dose) de causar dano a tecidos biológicos, abrangendo desde uma função bioquímica imprópria, dano aos órgãos, destruição tecidual e até morte, falamos então de toxicidade (Anusavice et al., 2012).

Como foi visto anteriormente, os adesivos estão sujeitos a fenómenos de degradação hidrolítica, desrupcionando as cadeias poliméricas e libertando monómeros. Além do mais, aquando da fase de fotopolimerização, esta nem sempre é completa, sendo que os monómeros que não entram nas ligações em cadeia, ficam livres (Wegehaupt et al., 2016).

A dispersão destes monómeros residuais através dos túbulos dentários pode induzir efeitos adversos na polpa, manifestando-se em concentrações que são consideradas tóxicas para as células pulpares (Goldberg, 2008; Wegehaupt et al., 2016).

Segundo se sabe, os mecanismos que fazem com que estes monómeros sejam tóxicos para a polpa, assentam na indução de stress oxidativo através da produção de radicais livres, e a formação de epóxidos, considerados mutagénicos, que levam à indução de apoptose das células da polpa (Stanislawski et al., 2003; Kleinsasser et al., 2004; Chang et al., 2010; Shirawachi et al., 2022)

Posto isto, o grau de toxicidade, bem como os efeitos adversos causados, estão em grande medida dependentes da composição do adesivo, sendo ditados pela quantidade, tipo e toxicidade dos monómeros eluídos (Costella et al., 2010; Elias et al., 2015).

Vários dos compostos utilizados frequentemente em adesivos universais já demonstraram citotoxicidade como é o caso Bis-GMA, UDMA, TEGMA, ou o HEMA (Hanks et al., 1991; Bakopoulou et al., 2009). No entanto, parece haver um consenso sobre a maior toxicidade do Bis-GMA, que apesar de ser um composto hidrofóbico e com um elevado peso molecular, se apresenta mais prejudicial para as células que os outros compostos, mesmo em concentrações reduzidas (Bakopoulou et al., 2009; Yano et al., 2011; Gupta et al., 2012).

4.1 Bis-GMA e derivados

Desde a sua introdução, em 1962, por Bowen e Rodriguez, que o Bis-GMA tem sido amplamente utilizado, devido principalmente às suas boas propriedades físicas e mecânicas (Sideridou et al., 2002). No entanto, este monómero tem vindo a ser muito questionado em relação à sua biocompatibilidade (Söderholm & Mariotti., 1999), tendo já vários estudos comprovado a sua toxicidade (Engelmann et al., 2004; Chang et al., 2010).

Uma das preocupações relativas à utilização de Bis-GMA prende-se na estrogenicidade, uma vez que contém Bisfenol A (BPA), um agente descrito como citotóxico e possível responsável por atividade estrogénica, agindo como um disruptor endócrino (Al Hiyasat et al., 2002; Fleisch et al., 2010; Schafer et al., 1999).

Este composto é um precursor sintético do Bis-GMA, que segundo a literatura é libertado no organismo após a aplicação de materiais restauradores contendo Bis-GMA, afetando o funcionamento celular normal (Bationo et al., 2021; Olea et al., 1996; Sasaki et al., 2005; De Nys et al., 2011; Van Landuyt et al., 2011; Małkiewicz et al., 2015). No entanto, numa corrente antagónica, vários autores defendem que o Bis-GMA não hidrolisa em BPA, devido à sua estrutura química que impede a hidrólise em ligação éster, sendo a quantidade libertada negligenciável (Hamid & Hume, 1997; Nathanson et al., 1997; Fleisch et al., 2010).

Facto é que, apesar da disparidade de resultados em relação à libertação deste composto proveniente de materiais dentários, não existem dúvidas quanto aos seus malefícios para a saúde, tanto a nível estrogénico como citotóxico, mesmo em pequenas quantidades (Al Hiyasat et al., 2002; Schafer et al., 1999; Welshons et al., 2006; Chang et al., 2010).

Como tal, a procura por compostos que consigam substituir eficazmente o Bis-GMA tem aumentado, num esforço para reduzir o contacto do BPA com a população (Yu et al., 2014; Kang et al., 2006).

4.2 Ensaaios de citotoxicidade

São utilizados 3 tipos de testes para analisar a biocompatibilidade no ramo da medicina dentária: testes *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos. Atualmente, os testes *in vitro* são considerados os testes de eleição para avaliação de materiais dentários, uma vez que são rápidos, baratos, e podem facilmente ser padronizados. Apesar da sua limitada capacidade de simular as interações complexas decorrentes no organismo, estes testes podem ser muito bem controlados para garantir dados altamente confiáveis e mensurações reprodutíveis na prática clínica (Van Meerbeek et al., 2010; Anusavice et al., 2012).

Antes de serem lançados no mercado, os produtos e dispositivos médicos e dentários novos ou modificados são sujeitos a uma série de testes que precedem os testes clínicos, de forma a serem aprovados pelas entidades reguladoras (Mishra, 2017).

Segundo a norma ISO 10993-5 (2009) (“International Standard of Biological Evaluation of Medical Devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity”), o teste standard para o estudo da citotoxicidade é o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5- difenil-2H-tetrazólio (MTT), que se baseia na redução de sais de tetrazólio para avaliar a atividade metabólica (Mosmann, 1983).

Este é um teste quantitativo, que consiste na capacidade de as células com metabolismo ativo converterem o MTT, de cor amarela, em cristais de formazan, de coloração azul-violeta, sendo depois medida a absorvância, para, com base na quantidade de formazan formado e intensidade da coloração obtida, se determinar a quantidade de células viáveis (Mosmann, 1983).

Apesar das suas vantagens e reconhecido bom desempenho, esta técnica tem, no entanto, algumas limitações, uma vez que o sinal depende apenas da capacidade metabólica e do

número de mitocôndrias para a redução enzimática do sal de tetrazólio. Assim sendo, quantifica a atividade metabólica das células, que é multifacetada, com apenas um parâmetro (Riss, 2017).

A sua interpretação é complexa e frequentemente leva a resultados inesperados ou não reprodutíveis, pois representa a toxicidade do tratamento, a viabilidade celular e a atividade metabólica numa única leitura. Uma alteração de apenas uma das peças deste puzzle (i.e., densidade celular e respetiva atividade metabólica) condiciona a reprodutibilidade do ensaio e compacta a informação recolhida (Berridge et al., 2005; Bushnell et al., 2010).

Assim sendo, será de grande utilidade a criação de um método *in vitro* para teste de adesivos experimentais que separasse as componentes em proliferação celular (Bhandi et al., 2021; Parmar et al., 2020), indução de apoptose (Chang et al., 2010), stress oxidativo (Chang et al., 2010), e dinâmica mitocondrial (Yan et al., 2021).

5. Enquadramento

A simplicidade e fácil utilização dos adesivos universais tornou esta classe de materiais muito atraente no que diz respeito à prática clínica, motivando cada vez mais o interesse na sua investigação (Gary, 2015; Perdigão & Swift, 2015).

Apesar da sua popularidade continuar a aumentar, estes ainda apresentam limitações, nomeadamente ao nível das propriedades físico-químicas e mecânicas, que contribuem para a degradação da interface entre o dente e a restauração (Nagarkar et al., 2019).

De modo a reduzir os fenómenos de *nano* e *microleakage*, foram já propostas várias estratégias para melhorar as propriedades destes materiais, nomeadamente ao nível da sua constituição, uma vez que tanto as performances *in vitro* como os ensaios clínicos parecem estar dependentes da sua composição química (Sezinando, 2014).

Outra das preocupações relacionadas com a composição química dos adesivos universais, é a utilização de Bis-GMA, monómero considerando como tendo potencial tóxico (Söderholm & Mariotti, 2019).

Neste sentido, têm sido introduzidos macrómeros dendrimétricos na composição de novos materiais restauradores, devido às suas características de polimerização e capacidades mecânicas (Vasconcelos e Cruz et al., 2019).

Os dendrímeros são macromoléculas globulares desenhadas à escala nanométrica com uma configuração aproximadamente esférica, contrariamente aos tradicionais polímeros lineares (Caminade et al., 2005). A utilização destes macrómeros tem-se mostrado promissora, tendo já apresentado boas propriedades quando introduzido na constituição de materiais restauradores, nomeadamente maior conversão de ligações duplas, menor contração de polimerização, maior energia de fratura, menor absorção de água e solubilidade (Yu et al., 2014).

Neste sentido, em 2019, Vasconcelos e Cruz et al., incorporaram pela primeira vez um dendrímero, G(2)-Metacrilato de 2-isocianoetilo (G-IEMA), num adesivo dentário, em detrimento do Bis-GMA (Vasconcelos e Cruz et al., 2019). Este novo adesivo experimental apresentou desde logo bons resultados, melhorando significativamente as taxas de conversão de ligação do adesivo, mas também reduzindo a contração da polimerização e contribuindo para um aumento da força de ligação à dentina (Vasconcelos e Cruz et al., 2020; Vasconcelos e Cruz et al., 2022).

Outra das potenciais vantagens da substituição do Bis-GMA por G-IEMA prende-se na citotoxicidade, uma vez que ao contrário do Bis-GMA, o G-IEMA não contém BPA na sua composição (Yu et al., 2014).

Assim nesta investigação laboratorial é proposto o estudo da citotoxicidade deste novo adesivo experimental com G-IEMA, comparando com 2 adesivos comerciais com BIS-GMA na sua composição.

Contudo, atualmente, existe uma grande necessidade de testes de citotoxicidade para adesivos experimentais (Wawrzynkiewicz et al., 2020). O estado da arte baseia-se em estudos por MTT como teste standard de citotoxicidade, no entanto, as suas limitações levam a interpretações complexas e, por vezes, a resultados inesperados ou não reprodutíveis (Berridge et al., 2005).

Isto deve-se ao facto de avaliar a capacidade metabólica das células, que depende de vários fatores, através de apenas um parâmetro (redução enzimática do sal de tetrazólio) (Parmar et al., 2020; Bhandi et al., 2021; Chang et al., 2010; Yan et al., 2021).

Assim, neste estudo, propomos também a utilização de uma série de testes *in vitro* sistematizados, de modo a alargar o output atual que se baseia em viabilidade celular, para incluir a indução de apoptose irreversível e a proliferação celular.

II. Objetivos do estudo

Avaliar a citotoxicidade de um adesivo experimental com G-IEMA, e comparar com 2 adesivos comerciais contendo Bis-GMA, construindo sobre os ensaios de citotoxicidade *in vitro* clássicos utilizando MTT, ao conjugar informação sobre viabilidade e ativação de apoptose, inicial, tardia e necrótica por citometria de fluxo com iodeto de propídio (Pi).

III. Hipóteses do estudo

Hipótese Nula 0.1: A citotoxicidade do adesivo experimental contendo G-IEMA, EM2, não difere em relação aos adesivos comerciais utilizados como controlo.

Hipótese Alternativa 1.1: A citotoxicidade do adesivo experimental contendo G-IEMA, EM2, difere em relação aos adesivos comerciais utilizados como controlo.

Hipótese Nula 0.2: A citotoxicidade do dendrímero G-IEMA, não difere em relação ao Bis-GMA.

Hipótese Alternativa 1.2: A citotoxicidade do dendrímero G-IEMA, difere em relação ao Bis-GMA.

Hipótese Nula 0.3: Os resultados obtidos no ensaio de MTT não diferem em relação aos resultados obtidos no ensaio de PI.

Hipótese Alternativa 1.3: Os resultados obtidos no ensaio de MTT diferem em relação aos resultados obtidos no ensaio de PI.

Hipótese Nula 0.4: Após o cultivo celular em discos de dentina, não se verifica a presença de células nos discos, nem a sua marcação com o iodeto de propídio.

Hipótese Alternativa 1.4: Após o cultivo celular em discos de dentina, verifica-se a presença de células nos discos de dentina, bem como a sua marcação com o iodeto de propídio.

IV. Materiais e Métodos

1. Amostra de estudo

A presente investigação foi aprovada pela Comissão de Ética do Instituto Universitário Egas Moniz, com o número de processo interno 1211.

Para a realização do estudo de citotoxicidade foram utilizados 3 adesivos universais, nomeadamente um adesivo experimental contendo G-IEMA na sua composição (EM2), e 2 comerciais, Scotchbond Universal (3M ESPE, St. Paul, USA) e Futurabond M+ (VOCO GmbH, Cuxhaven, Germany), para comparação. Foram também testados individualmente 5 monómeros presentes na constituição destes adesivos, G-IEMA (produzido internamente), Bis-GMA (Sigma Aldrich, Madrid, Espanha), HEMA (Sigma Aldrich, Madrid, Espanha), TEGDMA (Sigma Aldrich, Madrid, Espanha) e UDMA (Sigma Aldrich, Madrid, Espanha).

Todos os solventes e reagentes utilizados na formulação do adesivo experimental e testados individualmente foram adquiridos na Sigma Aldrich (Madrid, Espanha), à exceção do 10-MDP, que foi adquirido na Watson International Ltd. (Kunshan, China).

Para a formulação do G-IEMA, os reagentes e solventes foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha), Merck KGaA. (Darmstadt, Alemanha) e Carlo Erba (LABOSPIRIT Ltd., Loures, Portugal).

Para cada adesivo e monómero foram criados 2 grupos, um não polimerizado e outro na sua forma polimerizada, cada um com $n=12$.

Adicionalmente, numa tentativa de simular o mais fielmente possível as condições biológicas de aplicação dos adesivos, foram utilizados discos de dentina para cultivo celular, e posterior aplicação dos adesivos, de modo a tornar os resultados mais reprodutíveis em termos clínicos. Este teste devido à sua complexidade não foi ainda, para melhor do meu conhecimento, utilizado em nenhum manuscrito científico, pelo que se trata de um método exploratório.

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular e no Laboratório de Biomateriais, ambos no Instituto Universitário Egas Moniz.

1.1 Formulação do Adesivo Experimental/ G-IEMA

O adesivo experimental em análise nesta investigação foi formulado tendo como base a conformação química dos adesivos comerciais usados como controlo, à semelhança dos anteriores estudos realizados por Vasconcelos e Cruz et al., em 2019, 2020 e 2022.

Também o monómero G-IEMA, testado individualmente e utilizado na conformação do adesivo experimental, foi formulado seguindo o protocolo utilizado por Vasconcelos et al. em 2019, 2020 e 2022.

Na tabela 1 encontram-se expressas em percentagem as quantidades dos componentes presentes em cada adesivo.

Tabela 1. Composição dos adesivos em estudo (Tabela adaptada de Vasconcelos e Cruz et al., 2022)

MONÓMEROS (%)						
ADESIVO	G-IEMA	Bis-GMA	HEMA	TEGDMA	UDMA	10-MDP
SBU	0	15-25	15-25	0	0	0
FUT	0	10-25	10-25	0	2,5-5	0
EM2	10-15	0	10-25	5-10	10	5-10

FOTOINICIADORES/ SOLVENTES (%)					
ADESIVO	CQ	BDA	HPDPI	Etanol	Água
SBU	<2	<2	0	15-25	10-15
FUT	<2,5	0	0	10-25	0
EM2	<2	<2	1,5-2	18-28	10-15

1.2 Preparação dos Extratos

Para a preparação dos extratos, os adesivos e monómeros foram dissolvidos em Etanol, a uma concentração de 250 mg/mL, e posteriormente preparadas soluções *stock* em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), a uma concentração final de 0,125 mg/mL.

De modo a representar a real concentração de cada monómero nos adesivos, foram ainda realizadas diluições aos extratos de cada monómero, de acordo com quantidade relativa máxima em que figuram nos adesivos testados: G-IEMA – 15%, Bis-GMA – 25%, HEMA – 25%, TEGDMA – 10% e UDMA – 10%.

Na figura 1 é apresentado o esquema de diluição dos extratos dos adesivos e monómeros.

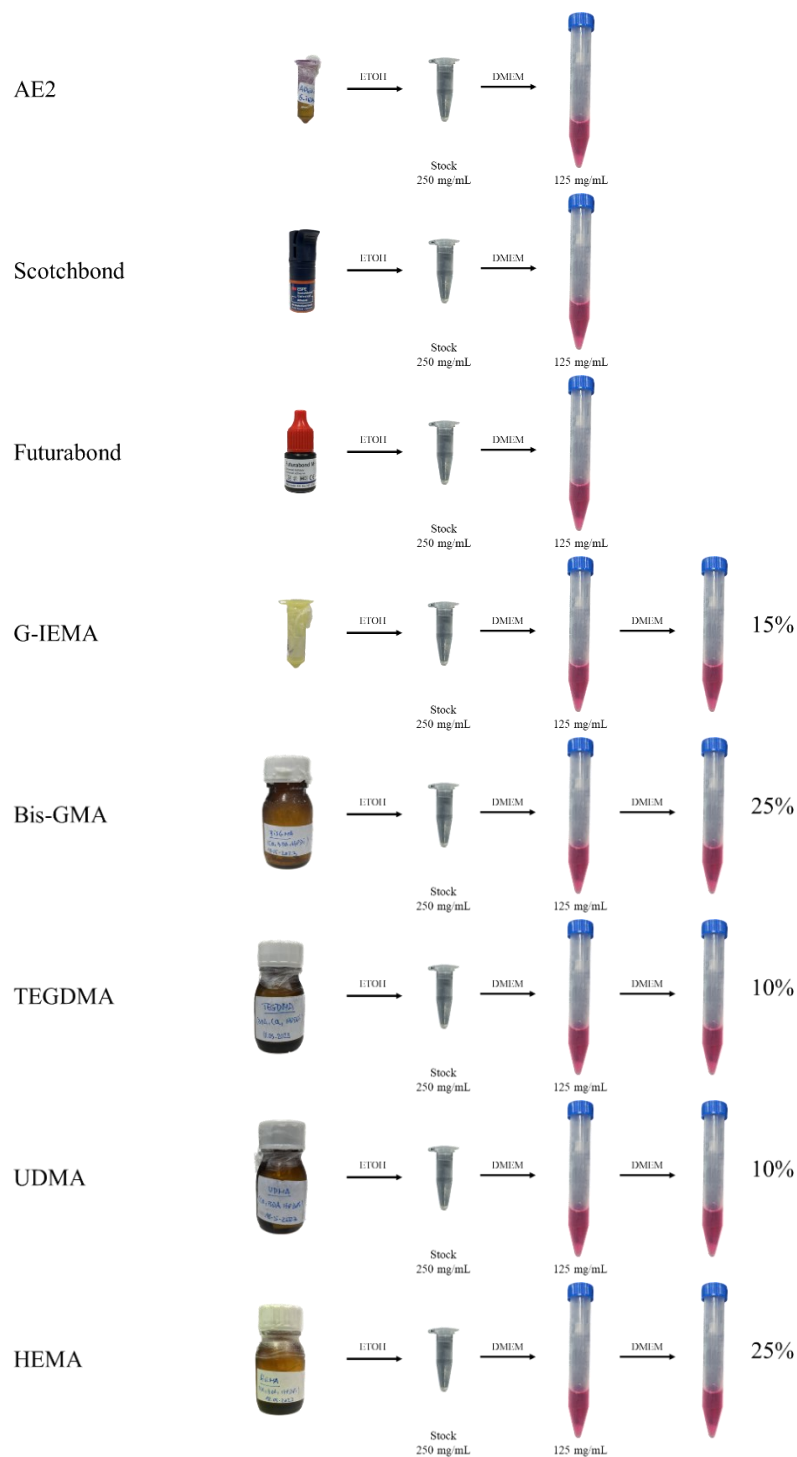


Figura 1. Esquema da diluição dos extratos não polimerizados

De modo a testar os efeitos dos adesivos e monómeros após a polimerização, foram também preparados extratos a partir de amostras polimerizadas.

Para tal, foram pipetados 100 μ L de cada adesivo e monómero para uma base de silicone esterilizada, e em seguida fotopolimerizados durante 40 segundos, utilizando o fotopolimerizador *Elipar Deep Cure-S (3M ESPE, EUA)*, a uma intensidade de 1470 mW/cm².

Com a ajuda de uma pinça esterilizada, cada disco foi passado para um tubo *Falcon* 15mL, aos quais foram adicionados 5mL de DMEM. Estes foram mantidos na incubadora *Sanyo MCO-18AIC CO2 (Frilabo II Lda., Maia, Portugal)*, a 37°C, durante 24 horas.

Na figura 2 é apresentado o esquema representativo da preparação dos extratos com os adesivos e monómeros polimerizados.

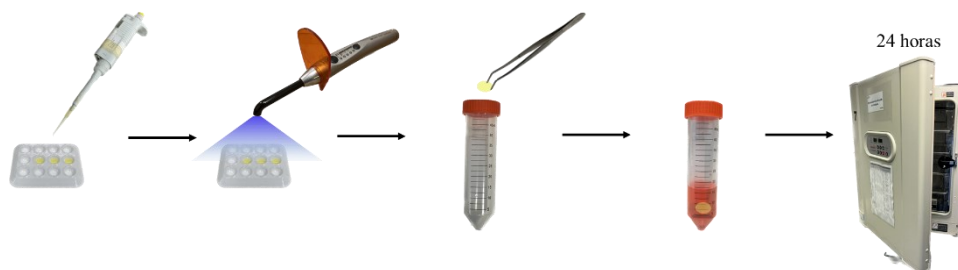


Figura 2. Esquema da preparação dos extratos com os adesivos e monómeros polimerizados

1.3 Obtenção dos Discos de Dentina

Os discos de dentina foram confeccionados a partir de 11 molares hígidos, obtidos no Banco de Dentes na Clínica Universitária Egas Moniz.

Após a extração, os dentes foram mantidos em Cloramina T a 0,5% durante 1 semana para desinfecção, e posteriormente armazenados em água destilada a 4°C (Armstrong et al., 2017).

Foram obtidos 2 discos por dente, com uma espessura de 0,5 mm, perfazendo um total de 22 discos em 11 dentes, sendo que para o mesmo dente um dos discos serviu como controlo para o outro no qual foi aplicado o adesivo, uma vez que a sua composição é teoricamente semelhante.

Os cortes foram efetuados perpendicularmente ao longo eixo do dente, na região entre a junção amelo-dentinária e o teto da câmara pulpar, utilizando o micrótomo de tecidos duros *Accuton 50* (*Struers A/S, Ballerup, Denmark*).

Antes da realização do procedimento experimental, os discos foram inseridos numa placa de 12 poços com Etanol e colocados na incubadora a 37°C durante 24 horas.

2. Cultura celular

2.1 Linhas celulares

Para a realização dos testes de citotoxicidade foi utilizada uma linha celular primária de células da polpa. Na figura 3 apresenta-se uma imagem microscópica das células da polpa utilizadas.



Figura 3. Imagem microscópica das células da polpa

As células foram adquiridas para a realização dos ensaios preliminares integrantes da tese de doutoramento da Prof. Doutora Joana Vasconcelos e Cruz, da qual resultou o adesivo experimental em estudo nesta investigação, com o título “*Propriedades físico-químicas, mecânicas e citotóxicas de um novo adesivo dentário contendo um dendrímero*”. As células foram posteriormente congeladas em azoto líquido (-196°C), a uma confluência de 90%, no máximo na 3ª passagem.

O protocolo de obtenção e congelamento das células encontra-se descrito no mesmo trabalho.

2.2 Descongelamento e incubação

Para o descongelamento das células, foi utilizado DMEM complementado com gentamicina e afontericina B. Este foi adicionado lentamente ao conteúdo celular, e foram realizados movimentos de *up & down*, até as células ficarem suspensas no meio, sendo depois passadas para um *Falcon* 50mL.

Após centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm, na centrifugadora *Heraeus Megafuge 1.0/1.0R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA)*, o meio foi removido e as células foram ressuspensas apenas em DMEM simples, e plaqueadas em placas de Petri. Por fim foram incubadas a 37°C, com pressão atmosférica de CO₂ de 5%.

Quando as células atingiram uma confluência de cerca de 90-95%, foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), e desagregadas com Tripsina-EDTA.

Em seguida foi realizada a contagem celular com o auxílio da solução de azul-tripan. Após o cálculo da concentração celular, foram realizadas as devidas diluições, e as soluções foram plaqueadas em placas de 96 poços, a uma concentração de 10.000 céls./mL. Na figura 4 é apresentada uma das placas com as culturas celulares.

Após estarem submersos em Etanol na incubadora durante 24 horas, também os discos de dentina foram plaqueados, a uma concentração celular de 100.000 céls./mL.

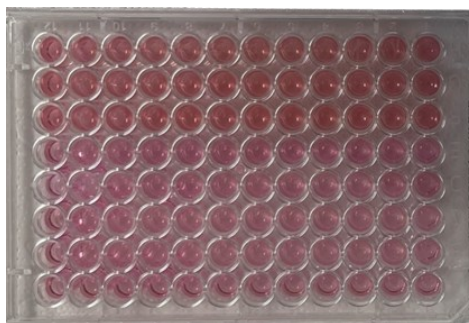


Figura 4. Fotografia das placas de 96 com a cultura celular

3. Ensaio de citotoxicidade

Todos os procedimentos laboratoriais envolvendo as células da polpa e os adesivos e monómeros em estudo foram realizados numa câmara de fluxo laminar (*Labculture® Class II Type A2 BSC (LA2), Esco Micro Pte. Ltd., Singapore*), apresentada na figura 5.



Figura 5. Fotografia da câmara de fluxo laminar

3.1 MTT

De modo a avaliar a viabilidade celular, foi realizado o teste de MTT, numa das placas de 96 poços previamente plaqueada com células da polpa.

Após as células atingirem uma confluência de 90-95%, removeu-se o meio de cultura e adicionaram-se 100 μ L dos extratos contendo adesivos e monómeros a cada poço,

seguindo a distribuição ilustrada na figura 6. A placa foi novamente incubada durante 24 horas.

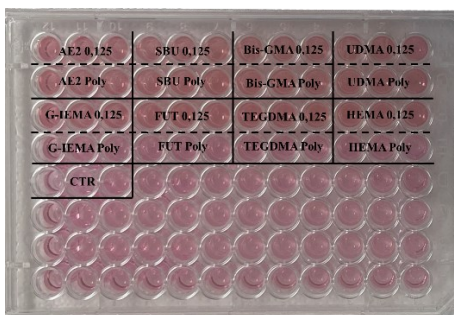


Figura 6. Imagem representativa da distribuição dos extratos na placa com a cultura celular

Passadas as 24 horas, começou por se aspirar os extratos, e lavar as células com 100uL de PBS por poço. Em seguida, foi adicionado a cada poço 100 μ L de solução de MTT (1:9 de solução de 5mg/mL de MTT *in* PBS, esterilizada por filtração, em DMEM), e colocado a incubar a 37°C durante 3 horas.

Passadas as 3 horas, foram adicionados 150 μ L de solução de isopropanol a cada poço, e a placa foi envolta em papel de alumínio e deixada a vibrar num agitador orbital, durante 1 hora, para solubilizar os cristais de formazam criados.

Por fim, foi medida a absorvância através de um leitor de microplacas (*Microplate reader AMP Platos R 496 AMEDA, AMP diagnostics, Graz, Austria*), num comprimento de onda de 595nm.

Na figura 7 é apresentado o esquema da realização do teste de MTT.

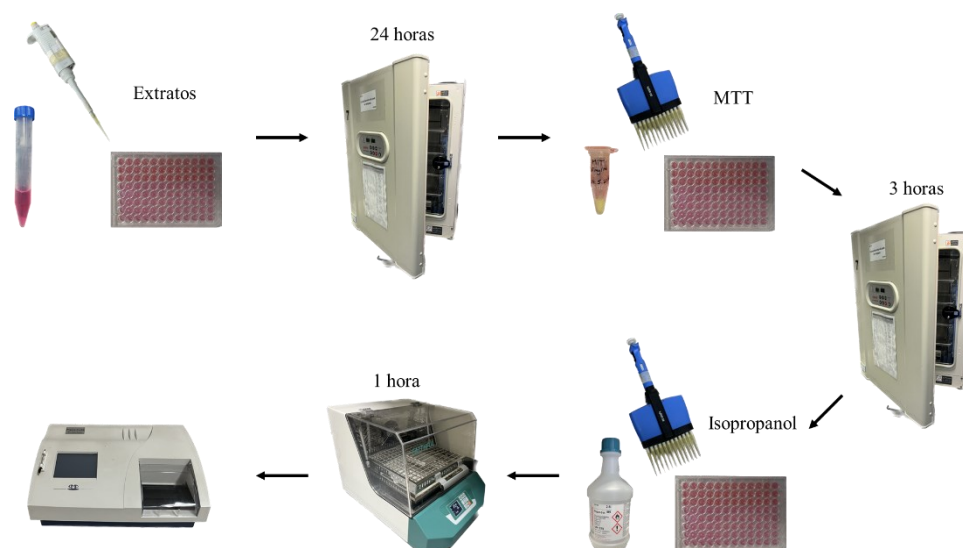


Figura 7. Esquema representativo do teste de MTT

3.2 *Pi*

A fim de quantificar a indução de apoptose celular não reversível após a exposição aos adesivos e monómeros, foi realizada a marcação com Pi , e posterior análise recorrendo a citometria de fluxo.

Começou por se remover o meio e adicionar a cada poço 100 μ L dos extratos com os monómeros e adesivo, segundo a disposição ilustrada na figura 6.

Passadas 24 horas, aspiraram-se os poços, que foram depois lavados com 100 μ L de PBS, sendo posteriormente adicionados 30 μ L de Tripsina-EDTA.

Depois de se verificar que as células foram eficazmente desagregadas pela ação da Tripsina-EDTA, foram adicionados 50 μ L de PBS e 20 μ L de DMEM, sendo que este inibe a ação desagregante da Tripsina-EDTA, e as soluções foram passadas para Eppendorfs devidamente identificados.

Procedeu-se então à centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos, numa centrífugadora *Heraeus Megafuge 1.0/1.0R* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

Finalmente foi adicionado 1 μL de uma solução com 1:10 de Pi em PBS a cada Eppendorf, e foram depois corridos por citometria de fluxo.

Na figura 8 é descrito o procedimento do teste com Pi.

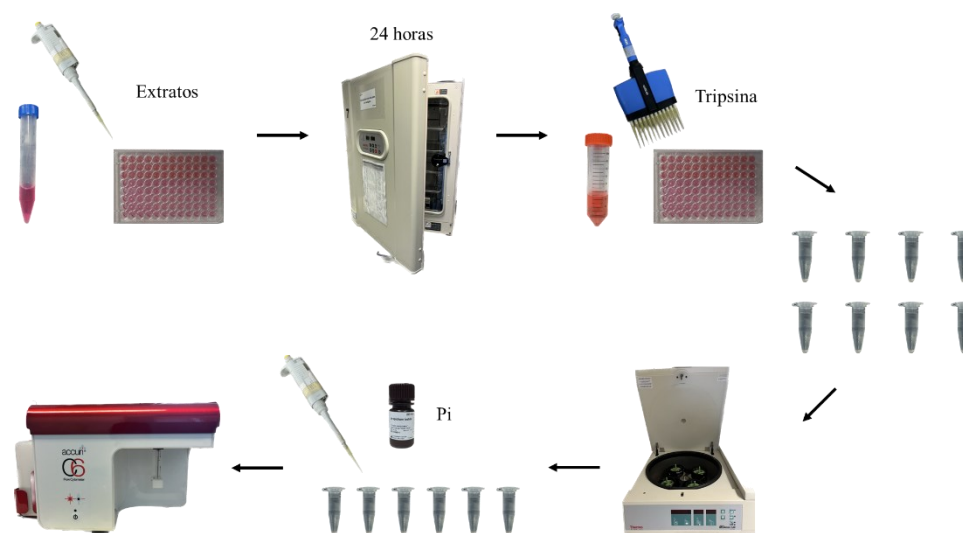


Figura 8. Esquema representativo do teste com Pi

3.3 Discos de dentina com Pi

Numa tentativa de reproduzir com maior exatidão o ambiente biológico sobre o qual os adesivos atuam, o cultivo celular foi também realizado em discos de dentina, para posterior aplicação dos adesivos, e avaliação da indução de apoptose irreversível através da marcação com Pi.

Neste ensaio não foram testados os monómeros, apenas os adesivos, sendo que para cada um foi efetuado o seguinte procedimento experimental: com a ajuda de uma pinça, o disco foi elevado e o lado que não continha as células seco levemente com uma gaze estéril. Em seguida foram aplicados nessa face, 2 μL do adesivo em questão, que foram espalhados pela superfície com a ajuda de um *microbrush*. O adesivo foi então fotopolimerizado durante 40 segundos e o disco colocado numa nova placa com a face que continha as células virada para cima. Foram depois adicionados 600 μL de meio (DMEM com gentamicina e anfotericina B).

Para o controlo foi utilizado o disco obtido a partir do mesmo dente, sendo realizados os mesmos procedimentos, à exceção da aplicação do adesivo. Ou seja, a face que não

continha as células foi também seca com uma gaze estéril e fotopolimerizada, não sendo aplicado o adesivo entre estes 2 passos. Foram também incluídos 3 controlos negativos, aos quais não se efetuou nenhum dos procedimentos descritos anteriormente.

No final a placa foi armazenada na incubadora a 37°C, sendo retirada 24 horas depois, para aplicação do Pi.

Após ser retirado o meio, foi feita a lavagem com PBS e a adição de Tripsina-EDTA, para desagregar as células. Estas foram então passadas para Eppendorfs devidamente identificados, aos quais foi adicionado meio (DMEM).

As soluções foram depois centrifugadas e o meio removido, sendo adicionados 100 μ L de meio novo. Finalmente foram adicionados a cada solução 1 μ L de solução de Pi em PBS, a uma concentração de 1:10, para depois serem corridos por citometria de fluxo.

Na figura 9 é apresentado um esquema representativo do protocolo de aplicação dos adesivos nos discos de dentina.

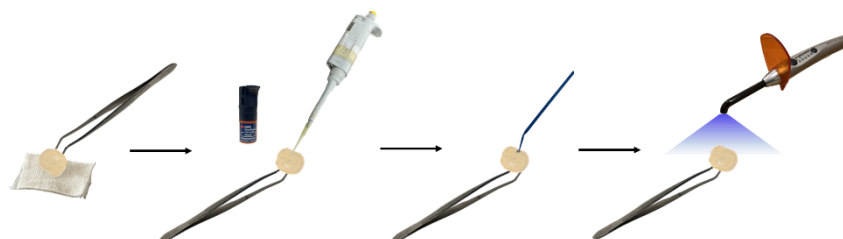


Figura 9. Esquema representativo de aplicação dos adesivos nos discos de dentina

3.4 Análise estatística

Todos os procedimentos de inferência estatística foram implementados ao nível de significância de 5%, usando o software IBM SPSS Statistics 29.0, tendo sido aplicados os testes ANOVA Two-way, Shapiro-Wilk, de Levene e de Tukey.

Para cada teste foram realizados 4 ensaios independentes, à exceção do teste de Pi nos discos de dentina, que apenas foi realizado 1 vez, por limitação da obtenção de discos de dentina.

V. Resultados

1. Análise da atividade metabólica (MTT) e indução de apoptose (PI) em adesivos polimerizados e não polimerizados

Aplicou-se o modelo ANOVA two-way aos dados da atividade metabólica (MTT) e indução de apoptose (PI) medidos em 4 tipos de adesivos polimerizados e não polimerizados, para avaliar o efeito destes 2 fatores (adesivo/tratamento) naquelas variáveis metabólicas.

A opção pelo modelo univariado em detrimento de uma abordagem multivariada resulta da inexistência de correlação entre as variáveis MTT e PI ($r = -0,041$; $p = 0,659$).

Previamente ao ajuste do modelo aos dados, validaram-se os pressupostos de normalidade, mediante aplicação o teste de Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade, mediante aplicação do teste de Levene. Em ambos os casos, não se detetaram violações desses pressupostos, para os dados de MTT. No entanto, para PI, verifica-se a normalidade da distribuição dos dados, mas a homocedasticidade foi violada. No entanto, esta violação não impede a aplicação do modelo, uma vez que o design experimental é praticamente balanceado ($n = 11/12$, por célula).

1.1 MTT

A tabela 2 apresenta os resultados do ajuste do modelo aos dados da atividade metabólica (MTT). Da análise destes resultados conclui-se que não existe interação entre os fatores adesivo e tratamento ($p = 0,959$), pelo que os efeitos desses fatores em MTT não dependem um do outro.

Verificam-se diferenças significativas entre adesivos, no que se refere ao teste de MTT ($p < 0,001$), os quais não dependem do tratamento aplicado, com uma potência observada bastante superior a 80%, não se verificando diferenças significativas entre amostras polimerizadas e não polimerizadas ($p = 0,812$), independentemente do tipo de adesivo.

Tabela 2. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da atividade metabólica (MTT) dos adesivos

Dependent Variable: Actividade Metabólica							
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power
Corrected Model	5,154	7	,736	35,264	<,001	246,848	1,000
Intercept	35,501	1	35,501	1700,166	<,001	1700,166	1,000
adesivo	5,151	3	1,717	82,225	<,001	246,674	1,000
tratamento	,001	1	,001	,057	,812	,057	,056
adesivo * tratamento	,006	3	,002	,102	,959	,306	,068
Error	1,817	87	,021				
Total	42,694	95					
Corrected Total	6,971	94					

O gráfico 1 ilustra os resultados obtidos a partir do teste MTT, apresentados em percentagem de atividade metabólica em relação ao grupo de controlo, normalizado a 100%.

Tanto para os extratos preparados com os adesivos polimerizados, como para os adesivos não polimerizados, as amostras de controlo apresentam valores médios de atividade metabólica significativamente mais elevados ($p < 0,001$) do que os dos adesivos EM2, Scotchbond e Futurabond.

Quando comparando os demais pares de adesivos entre si, não se verificaram diferenças nos valores médios de atividade metabólica, à exceção do Futurabond, que apresenta valores médios significativamente mais altos ($p = 0,007$) que o adesivo Scotchbond.

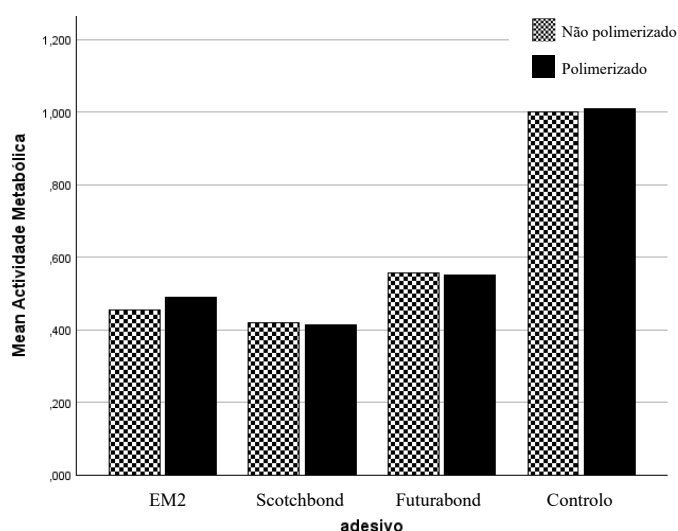


Gráfico 1. Atividade metabólica, em percentagem, dos diferentes adesivos. Foram verificadas diferenças significativas entre todos os adesivos estudados e o grupo de controlo, não se tendo verificado diferenças entre o adesivo experimental (EM2) e os adesivos comerciais, para nenhuma forma de tratamento.

1.2 P_i

A tabela 3 apresenta os resultados do ajuste do modelo aos dados da indução de apoptose. Da análise destes resultados conclui-se que existe interação entre os fatores adesivo e tratamento ($p = 0,019$), com uma potência observada de 76,1%, pelo que os efeitos desses fatores em P_i dependem um do outro.

Tabela 3. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da indução de apoptose (P_i) dos adesivos

Dependent Variable: Indução Apoptose							
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power
Corrected Model	,675	7	,096	17,472	<,001	122,302	1,000
Intercept	5,627	1	5,627	1019,303	<,001	1019,303	1,000
adesivo	,577	3	,192	34,848	<,001	104,543	1,000
tratamento	,042	1	,042	7,606	,007	7,606	,779
adesivo * tratamento	,058	3	,019	3,488	,019	10,465	,761
Error	,480	87	,006				
Total	6,761	95					
Corrected Total	1,155	94					

No gráfico 2 são apresentados os resultados do teste de P_i . Em relação à indução por apoptose, verificaram-se também diferenças significativas entre o controlo e os adesivos ($p < 0,001$, em todos os casos), tanto para os extratos preparados com os adesivos polimerizados, como para os adesivos não polimerizados.

Verifica-se ainda que o adesivo Scotchbond tem valor médio de indução de apoptose significativamente mais baixo do que o do adesivo Futurabond ($p = 0,006$), na ausência de polimerização. Não se verificam diferenças significativas de quaisquer outros pares de adesivos, nas várias condições de tratamento.

Olhando para as diferenças entre os extratos preparados através de adesivos polimerizados e não polimerizados, verifica-se que no adesivo Futurabond não polimerizado, o valor médio de indução de apoptose é significativamente mais elevado do que no adesivo polimerizado ($p < 0,001$). Analogamente, no adesivo EM2 não polimerizado, o valor médio de P_i é significativamente mais elevado do que no adesivo polimerizado ($p = 0,049$). Nos demais adesivos, não se detetam diferenças entre amostras polimerizadas/ não polimerizadas.

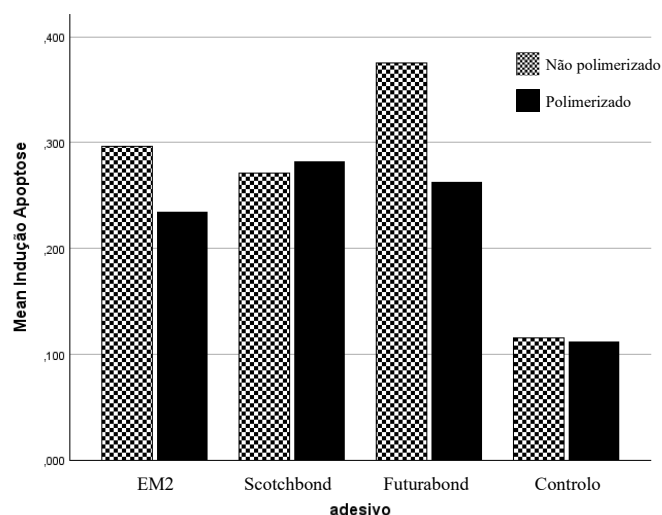


Gráfico 2. Valores de indução de apoptose, em percentagem, dos diferentes adesivos. Foram verificadas diferenças significativas entre todos os adesivos estudados e o grupo de controlo, não se tendo verificado diferenças entre o adesivo experimental (EM2) e os adesivos comerciais, para nenhuma forma de tratamento.

2. Análise da atividade metabólica (MTT) e indução de apoptose (PI) em monómeros polimerizados e não polimerizados

Aplicou-se o modelo ANOVA two-way aos dados da atividade metabólica (MTT) e indução de apoptose (PI) medidos em 5 monómeros diferentes polimerizados e não polimerizados, para avaliar o efeito destes 2 fatores (monómero/tratamento) naquelas variáveis metabólicas.

A opção pelo modelo univariado em detrimento de uma abordagem multivariada resulta da inexpressiva correlação entre as variáveis metabólicas MTT e PI, tal como indicado pelo valor $KMO = 0.5$.

Previamente à aplicação do modelo aos dados, validaram-se os respetivos pressupostos de normalidade, usando o teste de Shapiro-Wilk, e de homocedasticidade, mediante aplicação do teste de Levene. Em ambos os casos, não se detetaram violações desses pressupostos, para os dados de MTT. No entanto, para PI, verifica-se a normalidade da distribuição dos dados, mas a homocedasticidade foi violada. No entanto, esta violação não impede a aplicação do modelo, uma vez que o design experimental é balanceado ($n = 12$, por célula).

2.1 MTT

A tabela 4 apresenta os resultados do ajuste do modelo aos dados da atividade metabólica. Da análise destes resultados conclui-se que existe interação entre os fatores monómero e tratamento ($p = 0,003$), com uma potência observada de 91,4%, pelo que os efeitos desses fatores em MTT dependem um do outro.

Tabela 4. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da atividade metabólica (MTT) dos monómeros

Dependent Variable: Actividade Metabólica							
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power
Corrected Model	2,847	9	,316	23,442	<,001	210,981	1,000
Intercept	16,509	1	16,509	1223,539	<,001	1223,539	1,000
Monomero	2,619	4	,655	48,533	<,001	194,131	1,000
Tratamento	6,075E-6	1	6,075E-6	,000	,983	,000	,050
Monomero * Tratamento	,227	4	,057	4,213	,003	16,850	,914
Error	1,484	110	,013				
Total	20,840	120					
Corrected Total	4,331	119					

Os resultados do teste de MTT estão representados no gráfico 3, em percentagem de atividade metabólica em relação ao grupo de controlo, normalizado a 100%.

Na ausência de polimerização, o monómero TEGMA apresenta valores médios de atividade metabólica significativamente mais elevados quando comparado com os demais monómeros ($p < 0,001$); para além disso, o monómero Bis-GMA apresenta valores significativamente mais baixos do que os do monómero HEMA ($p = 0,009$). Não se verificam diferenças significativas entre os valores médios de atividade metabólica de quaisquer outros pares de monómeros, nestas condições de tratamento.

Sob efeito de polimerização, os monómeros TEGDMA e HEMA apresentam valores de atividade metabólica significativamente mais elevados do que os observados para os monómeros G-IEMA, Bis-GMA e UDMA ($p < 0,001$, em todos os casos), não apresentando diferenças significativas entre si. Não se verificam diferenças significativas entre os valores médios do ensaio de MTT de quaisquer outros pares de monómeros, nestas condições de tratamento.

No que se refere à comparação entre os extratos polimerizados e não polimerizados dentro do mesmo monómero, apenas se detetaram diferenças para o UDMA, sendo que o valor médio de atividade metabólica é significativamente mais elevado nas amostras não polimerizadas ($p = 0,037$), e para o monómero HEMA, no qual se verifica um valor médio significativamente mais elevado nas amostras polimerizadas ($p = 0,001$).

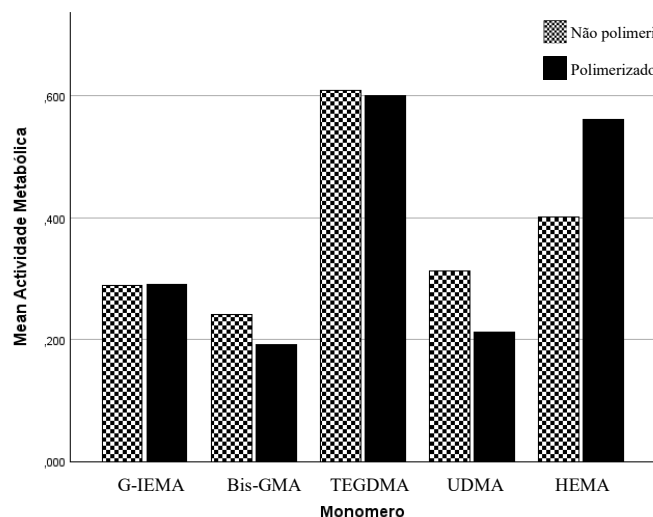


Gráfico 3. Atividade metabólica, em percentagem, dos diferentes monómeros. Foram verificadas diferenças significativas entre os vários adesivos, para ambas as formas de tratamento.

2.2 P_i

A tabela 5 apresenta os resultados do ajuste do modelo aos dados da indução de apoptose, dos quais se conclui que existe interação entre os fatores monómero e tratamento ($p = 0,002$), com uma potência observada de 94,1%.

Tabela 5. Resultados dos testes do ajuste do modelo aos dados da indução de apoptose (P_i) dos monómeros

Dependent Variable: Indução Apoptose							
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Noncent. Parameter	Observed Power
Corrected Model	,891	9	,099	9,835	<,001	88,516	1,000
Intercept	7,287	1	7,287	724,195	<,001	724,195	1,000
Monomero	,632	4	,158	15,703	<,001	62,813	1,000
Tratamento	,071	1	,071	7,072	,009	7,072	,750
Monomero * Tratamento	,187	4	,047	4,658	,002	18,631	,941
Error	1,107	110	,010				
Total	9,284	120					
Corrected Total	1,997	119					

No gráfico 4 são apresentados os resultados do teste de P_i . Na ausência de polimerização, o monómero Bis-GMA apresenta valores médios de indução de apoptose

significativamente mais elevados do que os registados nos demais monómeros ($p < 0,001$, em todos os casos). Não se verificam diferenças significativas entre os valores médios de PI de quaisquer outros pares de monómeros, nestas condições de tratamento.

Sob polimerização, os monómeros Bis-GMA e TEGDMA apresentam valores médios de PI significativamente mais elevados do que os observados nos monómeros G-IEMA e UDMA ($p < 0,001$, em ambos os casos), não apresentam diferenças significativas no entre eles ($p = 1,000$). Para além disso, o monómero Bis-GMA apresenta valores de indução de apoptose significativamente mais elevados do que os de HEMA ($p = 0,013$). Não se verificam diferenças significativas entre os valores médios de PI de quaisquer outros pares de monómeros, nestas condições de tratamento.

Para além disso, apenas para o monómero TEGDMA se verifica significativo aumento do valor médio de indução de apoptose nas amostras polimerizadas ($p < 0,001$) quando comparadas com as não polimerizadas; esse efeito é sugerido também para o monómero HEMA, mas não atinge significância estatística ($p = 0,052$). Para os demais monómeros, não se verificam diferenças significativas entre os valores médios de PI sob diferentes tratamentos.

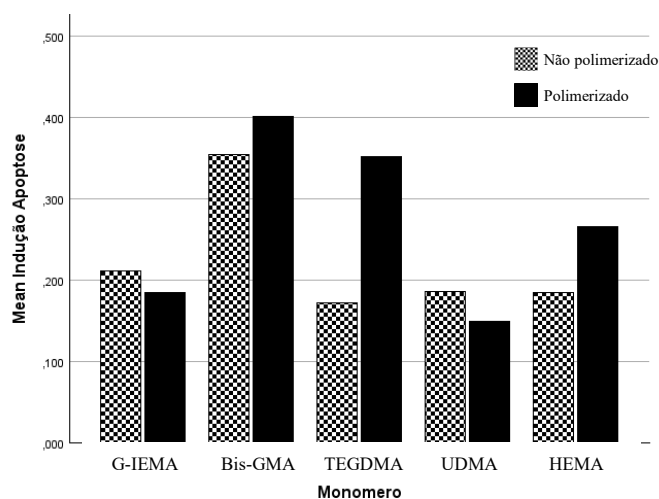


Gráfico 4. Valores de indução de apoptose, em percentagem, dos diferentes monómeros. Foram verificadas diferenças significativas entre os vários adesivos, para ambas as formas de tratamento.

3. Resultados do teste de Pi nos discos de dentina

Uma vez que não foi possível a repetição do ensaio de Pi nos discos de dentina, de modo a replicar os resultados obtidos, o número de amostras não foi suficiente para realizar uma análise estatística significativa.

No entanto, nos gráficos 5, 6, 7 e 8, estão representados os resultados obtidos neste ensaio, sendo que, apesar de em pequenas quantidades, se verifica a presença de células da polpa nos discos, para além de terem sido marcadas com sucesso com Pi, demonstrando assim a viabilidade deste tipo de teste.

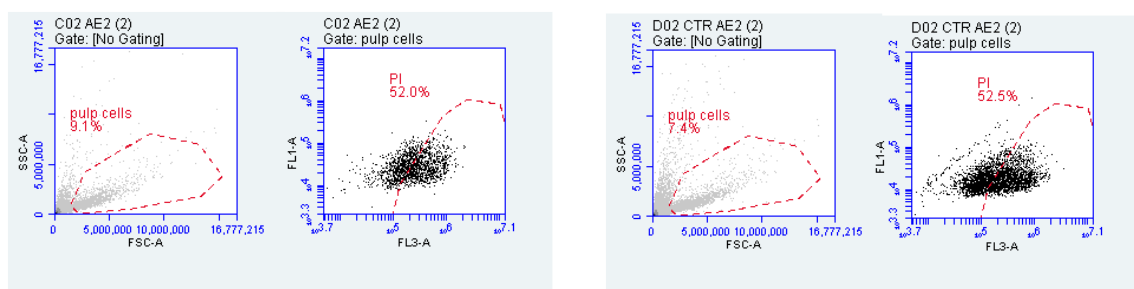


Gráfico 5. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi após aplicação do adesivo EM2, à esquerda, e respetivo controlo, à direita. É possível observar-se, para ambos os casos, a presença de células da polpa nos discos de dentina, no *gate* denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no *gate* denominado “PI”.

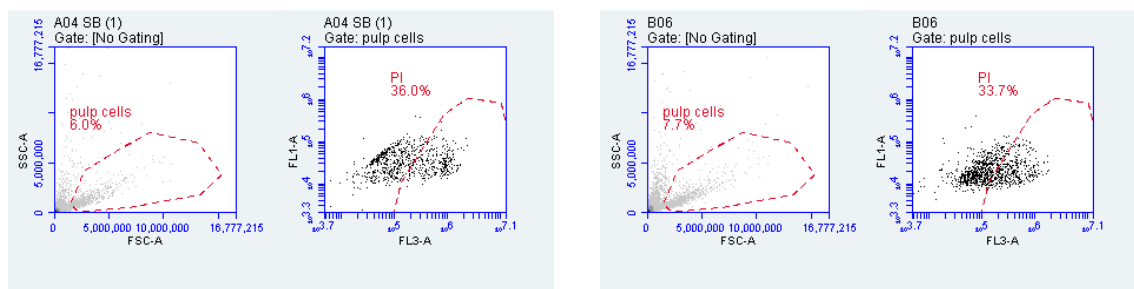


Gráfico 6. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi após aplicação do adesivo Scotchbond, à esquerda, e respetivo controlo, à direita. É possível observar-se, para ambos os casos, a presença de células da polpa nos discos de dentina, no *gate* denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no *gate* denominado “PI”.

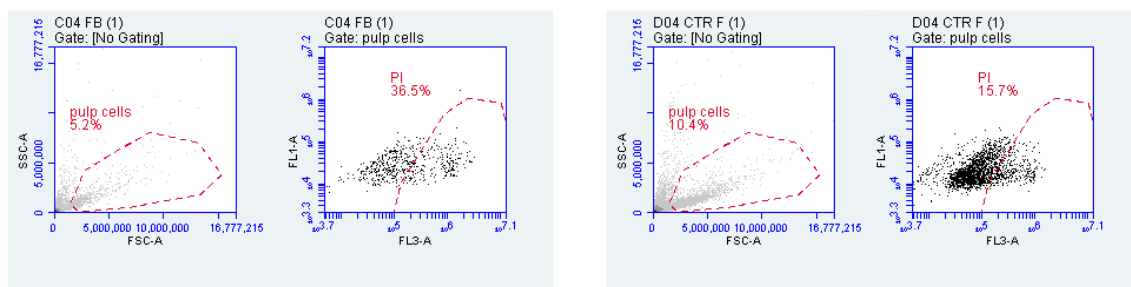


Gráfico 7. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi após aplicação do adesivo Futurabond, à esquerda, e respectivo controle, à direita. É possível observar-se, para ambos os casos, a presença de células da polpa nos discos de dentina, no *gate* denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no *gate* denominado “PI”.

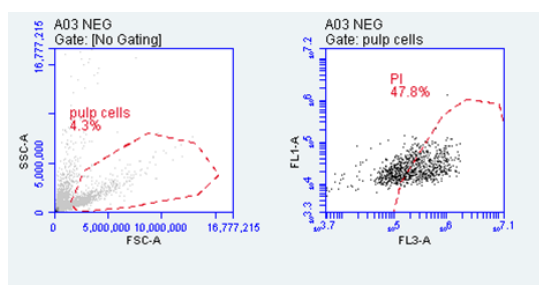


Gráfico 8. Gráficos ilustrativos dos resultados do teste de Pi do grupo de controlo negativo. É possível observar-se a presença de células da polpa nos discos de dentina, no *gate* denominado “pulp cells”, e a sua marcação com PI, no *gate* denominado “PI”.

VI. Discussão

Os adesivos universais constituem a mais recente geração de adesivos disponíveis no mercado, sendo a sua fácil utilização e versatilidade no que diz respeito à técnica utilizada, características que têm levado ao crescente interesse nesta classe de adesivos (Van Meerbeek et al., 2020).

Não obstante, a simplificação acarreta custos, nomeadamente no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas e biológicas: segundo vários ensaios, e apesar da disparidade de resultados, a performance dos novos adesivos universais está aquém do expectável, estando dependente de vários fatores externos, tais como a estratégia adesiva ou o substrato ao qual vão aderir (Rosa et al., 2015; Cuevas-Suárez et al., 2019), e internos, como o pH dos adesivos e principalmente a sua composição (Sezinando, 2014).

De modo precisamente a reforçar a estabilidade e resistência mecânica dos adesivos, estes contêm monómeros reticuláveis hidrofóbicos, que apresentam boas características mecânicas e retentivas (Van Landuyt et al., 2007). Para além do TEGDMA, UDMA e HEMA, um dos monómeros mais utilizados é o Bis-GMA, o que levanta preocupações ao nível da citotoxicidade, uma vez que contém BPA na sua composição, um composto altamente tóxico e possível disruptor endócrino (Al Hiyasat et al., 2002; Schafer et al., 1999; Fleisch et al., 2010).

Nesta perspetiva, têm sido reunidos esforços na otimização de adesivos universais que não contenham Bis-GMA na sua composição, sem comprometer as propriedades físico-químicas e biológicas, podendo estas até ser reforçadas. Até à data a escolha tem recaído sobre macrómeros dendrímetricos como possíveis substitutos do Bis-GMA. (Yu et al., 2014; Vasconcelos e Cruz et al., 2019)

Assim, esta investigação teve em vista avaliar a toxicidade de um adesivo experimental, o qual não conta com Bis-GMA na sua composição, substituído pelo dendrímero G-IEMA. Foram também avaliados os principais monómeros constituintes dos adesivos em análise, uma vez que, como já foi referido anteriormente, vários estudos indicam que as características dos adesivos universais estão fortemente relacionadas com a sua

composição química, sendo de grande interesse o estudo individual dos principais constituintes dos adesivos, para perceber o papel que cada monómero poderá ter na citotoxicidade geral do adesivo. Em adição, os efeitos citotóxicos dos diferentes monómeros e suas combinações ainda não são devidamente conhecidos, aumentando assim a pertinência desta investigação (Kim et al., 2015).

Apesar de amplamente descrito na literatura e de ser recomendado pelas normas ISO, a pouca especificidade do teste de MTT levou a uma mudança de paradigma nos testes de biossegurança dos materiais dentários, agora mais focados nos mecanismos que levam à citotoxicidade, de modo a perceber as suas causas, ao invés de apenas na morte celular (Wawrzynkiewicz et al., 2020).

Estes testes assentam na utilização da técnica de citometria de fluxo para a realização de ensaios que medem parâmetros como a indução de apoptose e necrose (Chang et al., 2010), proliferação celular (Bhandi et al., 2021; Parmar et al., 2020), stress oxidativo (Chang et al., 2010), e dinâmica mitocondrial (Yan et al., 2021), obtendo-se assim um panorama mais completo.

Um dos principais mecanismos de morte celular é a apoptose, que consiste na morte celular controlada, programada pela própria célula, como resposta a estímulos citotóxicos (Mantellini et al., 2003). Este mecanismo não é possível quantificar através do teste de MTT, que mede a atividade metabólica, o que reflete vários parâmetros para além da indução de apoptose (Ziegler & Groscurth, 2004). Deste modo foi realizado o ensaio de Pi, corante fluorescente que tem uma permeabilização da membrana citoplasmática muito lenta. Deste modo, é capaz de marcar as células em apoptose, ou seja, células cuja membrana citoplasmática se encontra permeável e permite a entrada do PI. Estas células cuja membrana se encontra permeabilizada estão em processo de apoptose tardia, que é irreversível (Riss & Moravec, 2004).

Apesar das claras vantagens de estudos mais abrangentes, Caldas et al. concluiu através de uma revisão sistemática realizada em 2018, que, apesar da sua reconhecida importância por parte da comunidade científica, existe uma fraca adesão a protocolos standartizados. O elevado número de metodologias, seja ao nível das linhas celulares utilizadas, protocolos de extração e exposição, e técnicas e concentrações utilizadas, limitam a viabilidade das comparações entre estudos (Franz et al., 2009; Jiang et al., 2017).

É, portanto, necessário o estabelecimento de uma base de testes sistematizados que forneça a informação necessária para obter conclusões sobre os mecanismos de citotoxicidade provocados pelos adesivos dentários, e que seja reprodutível para uma correta harmonização de resultados e comparação fiável entre estudos (Bushnell et al., 2010; Franz et al., 2009; Wawrzynkiewicz et al., 2020).

Os testes *in vitro* são cruciais na avaliação dos danos causados por materiais dentários, tanto a células como a tecidos, sendo clinicamente relevantes uma vez que vão estar em contacto direto com o organismo. No entanto, apesar das suas várias vantagens, os testes *in vitro*, são incapazes de mimetizar o ambiente biológico e as interações complexas que nele ocorrem. Não obstante, aquando da realização deste tipo de testes, deve-se tentar através de ambientes controlados, simular o mais fielmente possível os procedimentos clínicos, de modo a obter resultados clinicamente mais reprodutíveis (Schmalz et al., 2002; Anusavice et al., 2012).

Nesse sentido, para a realização deste estudo optou-se por não se utilizar a norma ISO 10993-12, (2007) no que diz respeito à concentração dos extratos a aplicar às células, uma vez que esta aconselha um rácio área de superfície/volume de meio de 6 cm²/mL, o que equivale a uma quantidade de adesivo polimerizado muito superior à utilizada na prática clínica (Vasconcelos e Cruz, 2020). Assim o protocolo utilizado foi baseado em estudos anteriores (Koulaouzidou et al., 2008; Koulaouzidou et al., 2009), em que a quantidade de adesivo utilizada se assemelha mais à prática clínica, com a diferença que os extratos não foram filtrados, técnica que é desaconselhada, uma vez que diminui substancialmente a toxicidade, removendo partículas em suspensão potencialmente tóxicas, mas que são provenientes do adesivo e também não são removidas durante a aplicação dos adesivos no consultório (ISO 10993-12, 2007).

É também sabido que grande parte da indução de toxicidade dos adesivos dentários deve-se à sua incompleta polimerização, que se traduz na libertação de monómeros residuais que, ao se difundirem pelos túbulos dentinários e chegarem à polpa, têm efeitos nocivos para a mesma (Wegehaupt et al., 2016). Segundo Goldberg (2008), a quantidade de monómeros residuais não polimerizados ronda entre os 1,5-5% do volume total.

Numa tentativa de simular a quantidade de adesivo e monómeros livres que efetivamente atingem a câmara pulpar, foram também preparados extratos com concentrações mais

reduzidas, a partir dos adesivos e monómeros não polimerizados, segundo o protocolo utilizado num estudo anterior, no entanto com concentrações mais baixas, de modo a se aproximarem das quantidades que atingem a polpa (Demirci et al., 2008). É também sabido que os adesivos são compostos por combinações de monómeros, presentes em diferentes concentrações, fator que influencia o potencial citotóxico de cada composto (Wawrzynkiewicz et al., 2020). Deste modo, os monómeros testados neste estudo foram diluídos mais uma vez, de acordo com a concentração máxima em que figuram nos 3 adesivos testados.

Segundo a literatura, é durante as primeiras 24 horas após a polimerização que ocorre a maior libertação de monómeros residuais, tendo sido por isso esse o tempo de contacto escolhido entre os extratos e os meios de cultura (Paula et al., 2019).

A linha celular utilizada foi escolhida em prol do tecido afetado: a polpa dentária. Foi demonstrado que diferentes tipos de células apresentam respostas variadas a agentes citotóxicos, o que reforça a necessidade da escolha de uma linha celular clinicamente relevante, daí a utilização de células primárias da polpa dentária, que estão em próximo contacto com os adesivos, nomeadamente em casos onde a cavidade é mais profunda (Cao et al., 2005; Demirci et al., 2008; Hanks et al., 1996; Şengün et al., 2011).

No que diz respeito aos resultados obtidos, foi possível verificar que para os 3 adesivos estudados a atividade metabólica diminui significativamente, dado apoiado pelos resultados do teste Pi, que demonstram um aumento, também ele significativo, relativamente à indução de morte celular por apoptose, quando comparados com o grupo de controlo.

Estes resultados são compatíveis com a literatura atual, que já provou extensamente que os sistemas adesivos são citotóxicos, causando efeitos adversos na polpa dentária (Demirci et al., 2008; Koulaouzidou et al., 2009; Lee et al., 2016; Murray et al., 2000; Şengün et al., 2011).

Relativamente à comparação do adesivo EM2 com os adesivos comerciais, não se verificaram diferenças significativas em nenhum dos ensaios, para ambas as formas de tratamento, sendo assim aceite a hipótese nula 0.1.

Atentando à relação entre as amostras de extratos com adesivos polimerizados e não polimerizados, para o mesmo tipo de adesivo, não se observam diferenças significativas

no ensaio de MTT. Já no teste do Pi, a indução por apoptose das amostras não polimerizadas de Futurabond e EM2 são superiores às das amostras polimerizadas, o que não acontece para as amostras de Scotchbond.

Uma possível explicação para este facto prende-se na taxa de conversão de polimerização. Segundo a literatura, a citotoxicidade dos materiais poliméricos está também relacionada com a taxa de conversão dos mesmos, uma vez que quanto maior a quantidade não polimerizada, maior o número de monómeros residuais libertados, aumentando a sua concentração nos tecidos, causando consequentemente mais efeitos adversos (Demirci et al., 2008; Koulaouzidou et al., 2009; Vasconcelos e Cruz, 2020). Deste modo, seria de esperar que os adesivos EM2 e Futurabond, que apresentam taxas de conversão mais elevadas, não libertassem uma quantidade tão elevada de monómeros residuais para o meio após a polimerização, sendo a menor citotoxicidade apresentada nestes extratos em comparação com as amostras não polimerizadas compreensível, uma vez que a taxa de conversão é irrelevante não havendo polimerização. Pela mesma lógica, e uma vez que o Scotchbond tem uma taxa de conversão menos eficaz, é natural que as suas amostras polimerizadas apresentem mais toxicidade.

Relativamente à comparação entre os resultados obtidos para os monómeros, estes parecem sugerir como o monómero mais tóxico o Bis-GMA, sendo este o único a apresentar valores significativamente mais baixos de atividade metabólica que o HEMA no teste de MTT, e registando valores de indução de apoptose significativamente mais elevados que todos os outros monómeros, na forma não polimerizada, apresentando nas amostras polimerizadas também valores significativamente superiores aos restantes, à exceção do TEGDMA e do HEMA.

Estes resultados reforçam a premissa de que o Bis-GMA é altamente prejudicial, sendo o mais citotóxico dos monómeros usualmente presentes nos sistemas adesivos (Chen et al., 2003; Hanks et al., 1991; Ratanasathien et al., 2003). Tanto o Bis-GMA como o UDMA são monómeros resinosos de elevado peso molecular, características que aliadas também à sua hidrofobicidade, dificultam a sua difusão (Bakopoulou et al., 2009). Ainda assim, estes compostos foram já identificados em extratos aquosos com amostras polimerizadas (Spahl et al., 1998), o que, mesmo em pequenas quantidades, pode ter efeitos adversos devido ao elevado potencial citotóxico destes monómeros (Bakopoulou et al., 2009; Engelmann et al., 2004).

Em adição, o teste de MTT parece sugerir que o monómero menos citotóxico é o TEGDMA, seguido do HEMA, apresentando valores significativamente mais altos que todos os outros nas amostras não polimerizadas, sendo que nas polimerizadas apenas não é significativamente menos tóxico que o HEMA.

No entanto, avaliando os resultados obtidos pelo TEGDMA no teste Pi, mais concretamente nas amostras polimerizadas, observam-se, a par do Bis-GMA, valores significativamente superiores de indução de apoptose em relação aos restantes monómeros (à exceção do HEMA, no caso do TEGDMA). Estes dados vão de encontro a vários estudos que, apesar de reconhecerem uma menor citotoxicidade do TEGDMA em relação a outros monómeros, relataram a indução de apoptose em células da polpa em maiores concentrações (Bianchi et al., 2013; Janke et al., 2003; Reichl et al., 2006; Spagnuolo et al., 2004). Embora a um menor grau, também o monómero HEMA é reconhecido na literatura como indutor de apoptose (Becher et al., 2006; Bianchi et al., 2013; Samuelsen et al., 2008), facto corroborado neste estudo pela ausência de diferenças significativas no teste de Pi entre o HEMA e o TEGDMA, tanto nos extratos polimerizados como não polimerizados.

Segundo Ratanasathien et al. (1995), o grau de toxicidade relativa, por ordem decrescente, dos principais monómeros constituintes dos adesivos dentários é Bis-GMA>UDMA>TEGDMA>HEMA. Analisando os dados desta investigação, podemos concluir que de uma forma grosseira se enquadram com os resultados de Ratanasathien et al. (1995), à exceção do TEGDMA e do HEMA.

Esse facto pode ser explicado nos extratos não polimerizados pelo uso de uma concentração maior de HEMA (25%) do que de TEGDMA (10%). O estudo dos monómeros individualmente não tem como objetivo a determinação do grau absoluto de toxicidade, mas sim comparar os efeitos que estes possam ter quando presentes na constituição dos adesivos em estudo, daí a utilização de concentrações diferentes, mimetizando a quantidade relativa presente nestes adesivos. Assim, não podemos concluir que o HEMA seja absolutamente mais citotóxico que o TEGDMA, no entanto, nos adesivos testados, causa mais efeitos adversos uma vez que se encontra em maior quantidade. Daí a superior toxicidade do HEMA apenas se revelar para as amostras não polimerizadas, sendo que relativamente às amostras polimerizadas não se verificam diferenças significativas entre estes monómeros em nenhum dos testes.

Ao compararmos os resultados do G-IEMA com o TEGDMA, verificamos que o segundo revela valores significativamente superiores de atividade metabólica no teste de MTT, para ambos os tratamentos. Já no teste de Pi, a única diferença significativa prendeu-se na superior indução de apoptose por parte das amostras polimerizadas do TEGDMA. Assim, podemos aferir que o G-IEMA tem um efeito mais negativo ao nível do ciclo metabólico das células da polpa, ao passo que o TEGDMA atua mais ao nível da indução de apoptose celular, como já foi visto anteriormente.

Quando comparado com o HEMA, o G-IEMA não apresentou diferenças significativas nos resultados do teste de Pi, para nenhum dos tratamentos. Já no que diz respeito ao teste de MTT, o dendrímero apresentou valores significativamente mais baixos de atividade metabólica que o HEMA, para as amostras polimerizadas. Deste modo, podemos concluir que apesar de em termos absolutos (amostras polimerizadas), o G-IEMA apresente maior toxicidade, se tivermos em consideração as quantidades relativas presentes nos adesivos estudados (amostras não polimerizadas), não parece haver diferenças significativas.

É também possível constatar a semelhança de resultados entre o G-IEMA e o UDMA, uma vez que não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos ensaios, para nenhuma forma de tratamento.

Finalmente, ao comparar os resultados do Bis-GMA com o G-IEMA constatamos que estes não apresentam diferenças significativas no que diz respeito à alteração da atividade metabólica. Não obstante, através do teste de Pi, podemos aferir a maior citotoxicidade do Bis-GMA em relação ao dendrímero, uma vez que o Bis-GMA apresenta valores de indução de apoptose significativamente superiores aos do G-IEMA, para ambos os tipos de tratamento, sendo assim rejeitada a hipótese nula 0.2.

Apesar da menor toxicidade do G-IEMA em relação ao Bis-GMA, não se registou uma diminuição de citotoxicidade do adesivo que contém o dendrímero ao invés do Bis-GMA, comparando com os comerciais. Uma das explicações possíveis recai sobre o facto de, aos olharmos para a composição dos adesivos em termos das concentrações dos restantes monómeros, denotamos que são muito variadas. A pouca informação existente sobre a interação entre os diferentes monómeros aponta para um efeito sinérgico no sentido do aumento da citotoxicidade, o que pode explicar a toxicidade semelhante entre os adesivos, uma vez que não se sabe se a interação específica entre 2 ou mais monómeros poderá

provocar um aumento exponencial do potencial citotóxico, através de diversos mecanismos (Sideridou et al., 2005; Tuncer et al., 2012).

Este facto poderá também explicar o porquê de no teste de MTT o Futurabond apresentar valores significativamente mais elevados que o Scotchbond, ao passo que no teste de Pi os resultados apontarem para uma significativamente menor indução de apoptose por parte do Scotchbond em relação ao Futurabond, para as amostras não polimerizadas.

Deste modo, são necessários mais estudos mais abrangentes, para analisar mais detalhadamente os diferentes monómeros, e perceber de que forma interagem entre si e quais as consequências dessa interação.

Ao compararmos os resultados dos ensaios de MTT e Pi, podemos constatar que não existe correlação entre os dois testes, tanto para os adesivos, como para os monómeros, sendo assim rejeitada a hipótese nula 0.3. Estes dados reforçam a premissa de que diferentes compostos causam citotoxicidade através de mecanismos variados, que não podem ser quantificados através de um teste ou uma variável, mas sim de um conjunto de testes padrão, que analisem as diferentes vias precursoras de citotoxicidade.

Numa tentativa de elevar a outro patamar a representação das interações *in vivo*, foram cultivadas células em discos de dentina, para depois se reproduzir o mais fielmente possível o protocolo clínico de aplicação dos adesivos, e avaliar os seus efeitos.

Apesar de serem necessários mais estudos sobre o papel da dentina na difusão dos monómeros residuais para a câmara pulpar, é consensual que a permeabilidade deste estrato o leva a agir como uma barreira protetora, não podendo o seu efeito ser desprezado quando se fala de reproduzir fielmente as interações *in vivo* (Galler et al., 2005; Jiang, et al., 2017; Özdal-Kurt et al., 2016; Şengün et al., 2011).

Apesar de neste estudo não ter sido possível obter resultados estatisticamente significantes neste desfo, o cultivo de uma monocamada de células da polpa sobre a dentina foi efetuado com sucesso, sendo assim rejeitada a hipótese nula 0.4, o que é um passo importante na evolução dos testes *in vitro* em direção a uma maior compatibilidade com as interações biológicas. Este dado foi possível constatar uma vez que após a aplicação do adesivo, os discos foram colocados numa nova placa esterilizada, sendo todas as células contabilizadas no citómetro, apesar de em pequena quantidade, eram provenientes da superfície dos discos.

Num próximo estudo seria interessante, além do aumento do número de células cultivadas, a captação de imagens das células aderidas à superfície da dentina, por Microscopia de Varrimento, uma vez que devido à opacidade da dentina, não é possível a sua visualização através de microscópios tradicionais nem lupas óticas.

Outro aspeto importante foi a realização do protocolo clínico de aplicação dos adesivos, envolvendo a fotopolimerização dos adesivos diretamente sobre a dentina, já com as células aderidas na superfície oposta. Uma alteração pertinente a efetuar neste procedimento em investigações futuras seria substituir a utilização de gaze estéril aquando da secagem, utilizando jatos de ar, tal como na prática, uma vez que pode ter influência na disseminação do adesivo pelos túbulos, facilitando a chegada à polpa.

VII. Conclusões

A partir desta investigação pode-se concluir que o adesivo experimental contendo G-IEMA, EM2, apresenta uma citotoxicidade equiparável aos adesivos universais disponíveis atualmente no mercado, confirmando a tese de que o G-IEMA é um substituto viável do Bis-GMA na confecção de sistemas adesivos dentários.

Adicionalmente, o G-IEMA mostrou ser aparentemente menos tóxico que o Bis-GMA, tendo apresentado resultados significativamente inferiores de indução de apoptose.

As diferenças registadas entre os ensaios de MTT e Pi reforçam a ideia de que um único teste não proporciona informação suficiente em relação aos mecanismos de citotoxicidade, sendo necessária a criação de uma base de testes sistematizados para avaliação do comportamento celular.

Pode-se também concluir que é possível cultivar células da polpa em dentina com sucesso.

VIII. Relevância Clínica

O crescente interesse na formulação de adesivo que reduzam o tempo de trabalho e a sensibilidade à técnica tem conferido uma relevância significativa ao desenvolvimento de novos materiais restauradores. Embora atendam a critérios desejáveis na prática clínica, os adesivos universais, mais recente geração de sistemas adesivos no mercado, têm apresentado resultados clínicos e *in vitro* aquém do expectável. Torna-se, portanto, imperativo explorar novas formulações.

Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado que a biocompatibilidade dos sistemas adesivos não é satisfatória. Porém, uma vez que os testes utilizados assentam apenas na medição da morte celular, são pouco conhecidos os mecanismos que levam à toxicidade dos adesivos.

Assim, de modo a permitir o avanço no desenvolvimento de adesivos universais mais eficazes e seguros, são necessários mais estudos sobre as características, formas de atuação, e interações dos seus constituintes, de modo a poderem ser realizadas novas formulações.

Como tal, a partir desta investigação foi possível avaliar a toxicidade de um promissor novo adesivo, bem como estudar os seus constituintes de uma forma um pouco mais aprofundada, podendo este ser um ponto de partida para a utilização cada vez mais frequente de testes mais abrangentes e clinicamente reprodutíveis.

IX. Perspetivas Futuras

Em trabalhos futuros, seria pertinente a realização de um número maior de testes, avaliando não só a atividade metabólica e indução de apoptose, mas também componentes como o stress oxidativo, dinâmica mitocondrial, e proliferação celular, de modo a construir uma futura base de testes sistematizados.

Para além do estudo da citotoxicidade dos adesivos, é também necessária a realização de um maior número de ensaios sobre os seus constituintes, tais como os monómeros, e as interações entre eles, com vista a facilitar a procura por combinações monoméricas eficazes.

Seria também interessante avaliar os efeitos dos adesivos a longo prazo, com diferentes períodos de observação, de modo a perceber a progressão linear dos efeitos citotóxicos às células.

De modo a aumentar a correlação entre os resultados clínicos e *in vitro*, seria pertinente a otimização do cultivo de células em discos de dentina e reprodução do protocolo clínico de aplicação dos adesivos, de modo a aproximar os ensaios das condições biológicas.

X. Bibliografia

1. Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H., & Elbetieha, A. M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility: Bisphenol A and fertility. *European Journal of Oral Sciences*, 110(2), 163–167. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2002.11201.x>
2. Anusavice, K. J., Phillips, R. W., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). Part I: General Classes and Properties of Dental Materials. in Phillips' science of dental materials (ed), *Standards for Dental Materials* (12nd ed, pp 9-10); *International Standards* (12nd ed, pp 10-11); ; *Biocompatibility - Adverse Effects from Exposure to Dental Materials* (12nd ed, pp. 111-117, 125-126); *Biocompatibility Tests* (12nd ed, pp 138-140); *Clinical Guidelines for Selecting Biocompatible Materials* (12nd ed, pp 141-143). USA: Elsevier.
3. Armstrong, S., Breschi, L., Özcan, M., Pfefferkorn, F., Ferrari, M., & Van Meerbeek, B. (2017). Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dental Materials*, 33(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.11.015>
4. Bakopoulou, A., Papadopoulos, T., & Garefis, P. (2009). Molecular Toxicology of Substances Released from Resin-Based Dental Restorative Materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3861–3899. <https://doi.org/10.3390/ijms10093861>
5. Bationo, R., Rouamba, A., Diarra, A., Beugré-Kouassi, M. L. A., Beugré, J., & Jordana, F. (2021). Cytotoxicity evaluation of dental and orthodontic light-cured composite resins. *Clinical and Experimental Dental Research*, 7(1), 40–48. <https://doi.org/10.1002/cre2.337>
6. Becher, R., Kopperud, H., Al, R., Samuelsen, J., Morisbak, E., Dahlman, H., Lilleaas, E., & Dahl, J. (2006). Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental Materials*, 22(7), 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.013>
7. Beniash, E., Stiffler, C. A., Sun, C.-Y., Jung, G. S., Qin, Z., Buehler, M. J., & Gilbert, P. U. P. A. (2019). The hidden structure of human enamel. *Nature Communications*, 10(1), 4383. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12185-7>

8. Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Em Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, pp. 127–152). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
9. Beyth, N., Domb, A. J., & Weiss, E. I. (2007). An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *Journal of Dentistry*, 35(3), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2006.07.009>
10. Bhandi, S., Alkahtani, A., Mashyakh, M., Ali Baeshen, H., Mustafa, M., Chohan, H., Boreak, N., & Patil, S. (2021). Study of optimal conditions for growth and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells based on glucose and serum content. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(11), 6359–6364. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.101>
11. Bianchi, L., Ribeiro, A. P. D., De Oliveira Carrilho, M. R., Pashley, D. H., De Souza Costa, C. A., & Hebling, J. (2013). Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells: Cytotoxicity of Experimental Adhesive Systems on Odontoblast-Like Cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101(8), 1498–1507. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32971>
12. Bowen, R. L., & Rodriguez, M. S. (1962). Tensile strength and modulus of elasticity of tooth structure and several restorative materials. *The Journal of the American Dental Association*, 64(3), 378–387. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1962.0090>
13. Buonocore, M. G. (1955). A Simple Method of Increasing the Adhesion of Acrylic Filling Materials to Enamel Surfaces. *Journal of Dental Research*, 34(6), 849–853. <https://doi.org/10.1177/00220345550340060801>
14. Buonocore, M. G., Matsui, A., & Gwinnett, A. J. (1968). Penetration of resin dental materials into enamel surfaces with reference to bonding. *Archives of Oral Biology*, 13(1), 61-IN20. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(68\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0003-9969(68)90037-X)
15. Bushnell, P. J., Kavlock, R. J., Crofton, K. M., Weiss, B., & Rice, D. C. (2010). Behavioral toxicology in the 21st century: Challenges and opportunities for behavioral scientists. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(3), 313–328. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.02.002>
16. Cadenaro, M., Antoniolli, F., Sauro, S., Tay, F. R., Di Lenarda, R., Prati, C., Biasotto, M., Contardo, L., & Breschi, L. (2005). Degree of conversion and

- permeability of dental adhesives. *European Journal of Oral Sciences*, 113(6), 525–530. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00251.x>
17. Caldas, I. P., Alves, G. G., Barbosa, I. B., Scelza, P., De Noronha, F., & Scelza, M. Z. (2019). In vitro cytotoxicity of dental adhesives: A systematic review. *Dental Materials*, 35(2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.028>
 18. Cao, T., Saw, T. Y., Heng, B. C., Liu, H., Yap, A. U. J., & Ng, M. L. (2005). Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology*, 25(2), 101–108. <https://doi.org/10.1002/jat.1041>
 19. Carvalho, R. M., Chersoni, S., Frankenberger, R., Pashley, D. H., Prati, C., & Tay, F. R. (2005). A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*, 26(9), 1035–1042. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.003>
 20. Carvalho, R. M., Manso, A. P., Geraldelli, S., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dental Materials*, 28(1), 72–86. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.09.011>
 21. Carvalho, R. M., Tjäderhane, L., Manso, A. P., Carrilho, M. R., & Carvalho, C. A. R. (2009). Dentin as a bonding substrate: Dentin bonding. *Endodontic Topics*, 21(1), 62–88. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00274.x>
 22. Chang, M.-C., Chen, L.-I., Chan, C.-P., Lee, J.-J., Wang, T.-M., Yang, T.-T., Lin, P.-S., Lin, H.-J., Chang, H.-H., & Jeng, J.-H. (2010). The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*, 31(32), 8164–8171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.049>
 23. Chen, R.-S., Liu, C.-C., Tseng, W.-Y., Jeng, J.-H., & Lin, C.-P. (2003). Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *Journal of Dentistry*, 31(3), 223–229. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(02\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(02)00088-X)
 24. Cheng, L., Zhang, L., Yue, L., Ling, J., Fan, M., Yang, D., Huang, Z., Niu, Y., Liu, J., Zhao, J., Li, Y., Guo, B., Chen, Z., & Zhou, X. (2022). Expert consensus on dental caries management. *International Journal of Oral Science*, 14(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00167-3>
 25. Costella, A. M., Trochmann, J. L., & Oliveira, W. S. (2010). Water sorption and diffusion coefficient through an experimental dental resin. *Journal of Materials*

- Science: Materials in Medicine, 21(1), 67–72. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3847-5>
26. Coulter, M. A. (2016). Minamata Convention on Mercury. *International Legal Materials*, 55(3), 582–616. <https://doi.org/10.5305/intelegamate.55.3.0582>
27. Cuevas-Suárez, C.E., da Rosa, W.L.O., Lund, R.G., da Silva, A.F., & Piva, E. (2019). Bonding Performance of Universal Adhesives: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent*, 21(1), 7-26. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a41975>
28. De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M., & Van Meerbeek, B. (2005). A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue: Methods and Results. *Journal of Dental Research*, 84(2), 118–132. <https://doi.org/10.1177/154405910508400204>
29. De Nys, S., Duca, R. C., Vervliet, P., Covaci, A., Boonen, I., Elskens, M., Vanoirbeek, J., Godderis, L., Van Meerbeek, B., & Van Landuyt, K. L. (2021). Bisphenol A as degradation product of monomers used in resin-based dental materials. *Dental Materials*, 37(6), 1020–1029. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.03.005>
30. Demirci, M., Hiller, K., Bosl, C., Galler, K., Schmalz, G., & Schweikl, H. (2008). The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dental Materials*, 24(3), 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.06.009>
31. Dressano, D., Salvador, M. V., Oliveira, M. T., Marchi, G. M., Fronza, B. M., Hadis, M., Palin, W. M., & Lima, A. F. (2020). Chemistry of novel and contemporary resin-based dental adhesives. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 110, 103875. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103875>
32. Eick, J. D., Wilko, R. A., Anderson, C. H., & Sorensen, S. E. (1970). Scanning Electron Microscopy of Cut Tooth Surfaces and Identification of Debris by Use of the Electron Microprobe. *Journal of Dental Research*, 49(6), 1359–1368. <https://doi.org/10.1177/00220345700490063601>
33. Elias, S. T., Santos, A. F. D., Garcia, F. C. P., Pereira, P. N. R., Hilgert, L. A., Fonseca-Bazzo, Y. M., Guerra, E. N. S., & Ribeiro, A. P. D. (2015). Cytotoxicity of Universal, Self-Etching and Etch-and-Rinse Adhesive Systems According to

- the Polymerization Time. *Brazilian Dental Journal*, 26(2), 160–168.
<https://doi.org/10.1590/0103-6440201300294>
34. Engelmann, J., Janke, V., Volk, J., Leyhausen, G., Von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., & Geurtsen, W. (2004). Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 25(19), 4573–4580. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.048>
 35. Erickson, R. L., Barkmeier, W. W., & Latta, M. A. (2009). The role of etching in bonding to enamel: A comparison of self-etching and etch-and-rinse adhesive systems. *Dental Materials*, 25(11), 1459–1467. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.07.002>
 36. FDI policy statement on Minimal Intervention Dentistry (MID) for managing dental caries. (2017). *International Dental Journal*, 67(1), 6–7. <https://doi.org/10.1111/idj.12308>
 37. Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., & Simmer, J. P. (1999). The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. *Journal of Structural Biology*, 126(3), 270–299. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4130>
 38. Finger, W. J., & Balkenhol, M. (1999). Practitioner variability effects on dentin bonding with an acetone-based one-bottle adhesive. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 1(4), 311–314.
 39. Fleisch, A. F., Sheffield, P. E., Chinn, C., Edelstein, B. L., & Landrigan, P. J. (2010). Bisphenol A and Related Compounds in Dental Materials. *Pediatrics*, 126(4), 760–768. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-2693>
 40. Frankenberger, R., Lohbauer, U., Roggendorf, M. J., Naumann, M., & Taschner, M. (2008). Selective enamel etching reconsidered: Better than etch-and-rinse and self-etch? *The Journal of Adhesive Dentistry*, 10(5), 339–344.
 41. Franz, A., König, F., Lucas, T., Watts, D. C., & Schedle, A. (2009). Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dental Materials*, 25(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.07.003>
 42. Galler, K., Hiller, K., Ettl, T., & Schmalz, G. (2005). Selective Influence of Dentin Thickness upon Cytotoxicity of Dentin Contacting Materials. *Journal of Endodontics*, 31(5), 396–399. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000145428.26880.e5>

43. Garberoglio, R., & Brännström, M. (1976). Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of Oral Biology*, 21(6), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(76\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(76)80003-9)
44. Gary, A. (2015). Universal adhesives: the next evolution in adhesive dentistry? *Compend Contin Educ Dent*, 36(1), 15-26; quiz 28, 40.
45. Goldberg, M. (2008). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: A review. *Clinical Oral Investigations*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0162-8>
46. Hagger O. Swiss patent 278,946; British patent 687,299. 1951.
47. Hamid, A., & Hume, W. R. (1997). A study of component release from resin pit and fissure sealants in vitro. *Dental Materials*, 13(2), 98–102. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(97\)80018-8](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(97)80018-8)
48. Hanks, C. T., Strawn, S. E., Watahai, J. C., & Craig, R. G. (1991). Cytotoxic Effects of Resin Components on Cultured Mammalian Fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 70(11), 1450–1455. <https://doi.org/10.1177/00220345910700111201>
49. Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*, 12(3), 186–193. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(96\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(96)80020-0)
50. Hashimoto, M., Sano, H., Yoshida, E., Hori, M., Kaga, M., Oguchi, H., & Pashley, D.H. (2004). Effects of multiple adhesive coatings on dentin bonding. *Oper Dent*, 29(4), 416-23.
51. Hayashi M. (2020). Adhesive Dentistry: Understanding the Science and Achieving Clinical Success. *Dental clinics of North America*, 64(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2020.05.001>
52. ISO 10993-12. (2007). Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials.
53. ISO 10993-5. (2009). Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
54. ISO 11405. (2015). Dentistry — Testing of adhesion to tooth structure.
55. Janke, V., Von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (2003). TEGDMA Causes Apoptosis in Primary Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 82(10), 814–818. <https://doi.org/10.1177/154405910308201010>

56. Jiang, R. D., Lin, H., Zheng, G., Zhang, X. M., Du, Q., & Yang, M. (2017). In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *Journal of dentistry*, 58, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.01.003>
57. Kanca, J. (1992). Effect of resin primer solvents and surface wetness on resin composite bond strength to dentin. *American Journal of Dentistry*, 5(4), 213–215.
58. Kang, J.-H., Kondo, F., & Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2–3), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.009>
59. Kim, EC, Park, H., Lee, SI, & Kim, SY (2015). Efeito do Monômero de Resina Dental Ácido 10-metacrilóiloxidecil Dihidrogeno Fosfato na Diferenciação Odontoblástica de Células Pulmonares Dentárias Humanas. *Farmacologia e toxicologia básica e clínica*, 117 (5), 340–349. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12404>
60. Kleinsasser, N. H., Wallner, B. C., Harréus, U. A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R., Kehe, K., & Reichl, F.-X. (2004). Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of Dentistry*, 32(3), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2003.11.002>
61. Koulaouzidou, E. A., Helvatjoglu-Antoniades, M., Palaghias, G., Karanika-Kouma, A., & Antoniades, D. (2008). Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 271–276. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30870>
62. Koulaouzidou, E. A., Helvatjoglu-Antoniades, M., Palaghias, G., Karanika-Kouma, A., & Antoniades, D. (2009). Cytotoxicity of Dental Adhesives In Vitro. *European Journal of Dentistry*, 03(01), 03–09. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1697399>
63. Lawn, B. R., Lee, J. J.-W., & Chai, H. (2010). Teeth: Among Nature's Most Durable Biocomposites. *Annual Review of Materials Research*, 40(1), 55–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070909-104537>
64. Lee, Y., An, S.-Y., Park, Y.-J., Yu, F. H., Park, J.-C., & Seo, D.-G. (2016). Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line: Cytotoxicity of one-step self-etching adhesives. *Scanning*, 38(1), 36–42. <https://doi.org/10.1002/sca.21236>

65. Loguercio, A. D., Bittencourt, D. D., Baratieri, L. N., & Reis, A. (2007). A 36-month evaluation of self-etch and etch-and-rinse adhesives in noncarious cervical lesions. *The Journal of the American Dental Association*, 138(4), 507–514. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2007.0204>
66. Lührs, A.-K., Guhr, S., Schilke, R., Borchers, L., Geurtsen, W., & Günay, H. (2008). Shear Bond Strength of Self-etch Adhesives to Enamel with Additional Phosphoric Acid Etching. *Operative Dentistry*, 33(2), 155–162. <https://doi.org/10.2341/07-63>
67. Luque-Martinez, I. V., Perdigão, J., Muñoz, M. A., Sezinando, A., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2014). Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dental Materials*, 30(10), 1126–1135. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.002>
68. Małkiewicz, K., Turło, J., Marciniuk-Kluska, A., Grzech-Leśniak, K., Gašior, M., & Kluska, M. (2015). Release of bisphenol A and its derivatives from orthodontic adhesive systems available on the European market as a potential health risk factor. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(1), 172–177. <https://doi.org/10.5604/12321966.1141390>
69. Mantellini, M. G., Botero, T. M., Yaman, P., Dennison, J. B., Hanks, C. T., & Nör, J. E. (2003). Adhesive Resin Induces Apoptosis and Cell-cycle Arrest of Pulp Cells. *Journal of Dental Research*, 82(8), 592–596. <https://doi.org/10.1177/154405910308200804>
70. Marshall, G. W., Marshall, S. J., Kinney, J. H., & Balooch, M. (1997). The dentin substrate: Structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry*, 25(6), 441–458. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00065-6)
71. Mishra, S. (2017). FDA, CE mark or something else?—Thinking fast and slow. *Indian heart journal*, 69(1), 1-5.
72. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
73. Moszner, N., Salz, U., & Zimmermann, J. (2005). Chemical aspects of self-etching enamel–dentin adhesives: A systematic review. *Dental Materials*, 21(10), 895–910. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.001>

74. Muñoz, M.A., Luque, I., Hass, V., Reis, A., Loguercio, A.D., & Bombarda, N.H. (2013). Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*, 41(5), 404–411. <https://doi:10.1016/j.jdent.2013.03.001>.
75. Nagarkar, S., Theis-Mahon, N., & Perdigão, J. (2019). Universal dental adhesives: Current status, laboratory testing, and clinical performance. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(6), 2121–2131. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34305>
76. Nakabayashi, N., Kojima, K., & Masuhara, E. (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of Biomedical Materials Research*, 16(3), 265–273. <https://doi.org/10.1002/jbm.820160307>
77. Nathanson, D., Lertpitayakun, P., Lamkin, M. S., Edalatpour, M., & Chou, L. L. (1997). IN VITRO ELUTION OF LEACHABLE COMPONENTS FROM DENTAL SEALANTS. *The Journal of the American Dental Association*, 128(11), 1517–1523. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1997.0091>
78. Neumann, M. G., Miranda, W. G., Schmitt, C. C., Rueggeberg, F. A., & Correa, I. C. (2005). Molar extinction coefficients and the photon absorption efficiency of dental photoinitiators and light curing units. *Journal of Dentistry*, 33(6), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.11.013>
79. Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M., & Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives*, 104(3), 298–305. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104298>
80. Özdal-Kurt, F., Şen, B. H., Tuğlu, I., Vatansever, S., Türk, B. T., & Deliloğlu-Gürhan, I. (2016). Attachment and growth of dental pulp stem cells on dentin in presence of extra calcium. *Archives of Oral Biology*, 68, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.04.008>
81. Parmar, A., Ansari, N., Parmar, G., & Krishnakumar, A. (2020). Evaluation of cell viability of human dental pulp stem cells in two dimensional and three dimensional fibrin glue scaffold. *Journal of Conservative Dentistry*, 23(5), 479. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_439_20
82. Pashley, David H. (1989) "Dentin: A Dynamic Substrate - A Review," *Scanning Microscopy*: Vol. 3: No. 1, Article 19.

83. Pashley, D. H., Livingston, M. J., & Greenhill, J. D. (1978). Regional resistances to fluid flow in human dentine in vitro. *Archives of Oral Biology*, 23(9), 807–810. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(78\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0003-9969(78)90159-0)
84. Pashley, D.H. (1984). Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent Suppl*, 3, 13–29.
85. Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>
86. Paul, S. J., Leach, M., Rueggeberg, F. A., & Pashley, D. H. (1999). Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *Journal of Dentistry*, 27(3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(98\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(98)00042-6)
87. Paula, A. B., Toste, D., Marinho, A., Amaro, I., Marto, C. M., Coelho, A., Marques-Ferreira, M., & Carrilho, E. (2019). Once Resin Composites and Dental Sealants Release Bisphenol-A, How Might This Affect Our Clinical Management? -A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health*, 16(9), 1627. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091627>
88. Perdigão J, & Frankenberger R. (2001). Effect of solvent and rewetting time on dentin adhesion. *Quintessence Int*, 32(5), 385-90.
89. Perdigão, J. (2002). Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dental Clinics of North America*, 46(2), 277–301. [https://doi.org/10.1016/S0011-8532\(01\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0011-8532(01)00008-8)
90. Perdigão, J., Geraldeli, S., & Hodges, J. S. (2003). Total-etch versus self-etch adhesive. *The Journal of the American Dental Association*, 134(12), 1621–1629. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0109>
91. Perdigão, J., Gomes, G., Duarte, S., & Lopes, M. M. (2005). Enamel bond strengths of pairs of adhesives from the same manufacturer. *Operative Dentistry*, 30(4), 492–499.
92. Perdigão, J. (2007). New Developments in Dental Adhesion. *Dental Clinics of North America*, 51(2), 333–357. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.01.001>
93. Perdigão, J. (2010). Dentin bonding—Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials*, 26(2), e24–e37. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.149>

94. Perdigão, J., & Swift, E. J. (2015). Universal Adhesives. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 27(6), 331–334. <https://doi.org/10.1111/jerd.12185>
95. Perdigão, J. (2020). Current perspectives on dental adhesion: (1) Dentin adhesion – not there yet. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 190–207. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.08.004>
96. Peumans, M., Kanumilli, P., Demunck, J., Vanlanduyt, K., Lambrechts, P., & Vanmeerbeek, B. (2005). Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dental Materials*, 21(9), 864–881. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.02.003>
97. Pfeifer, C. S. (2017). Polymer-Based Direct Filling Materials. *Dental Clinics of North America*, 61(4), 733–750. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.002>
98. Plasmans, P. J. J. M., Creugers, N. H. J., & Mulder, J. (1998). Long-term Survival of Extensive Amalgam Restorations. *Journal of Dental Research*, 77(3), 453–460. <https://doi.org/10.1177/00220345980770030401>
99. Ratanasathien, S., Wataha, J. C., Hanks, C. T., & Dennison, J. B. (1995). Cytotoxic Interactive Effects of Dentin Bonding Components on Mouse Fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 74(9), 1602–1606. <https://doi.org/10.1177/00220345950740091601>
100. Reichl, F.-X., Esters, M., Simon, S., Seiss, M., Kehe, K., Kleinsasser, N., Folwaczny, M., Glas, J., & Hickel, R. (2006). Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. *Archives of Toxicology*, 80(6), 370–377. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0044-2>
101. Riss, T. (2017). Is your MTT assay really the best choice. Promega™, Madison, Wisconsin, United States.
102. Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62. <https://doi.org/10.1089/154065804322966315>
103. Rosa, W. L. D. O. D., Piva, E., & Silva, A. F. D. (2015). Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 43(7), 765–776. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.003>

104. Salz, U., Zimmermann, J., Zeuner, F., & Moszner, N. (2005). Hydrolytic stability of self-etching adhesive systems. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 7(2), 107–116.
105. Samuelsen, J. T., Holme, J. A., Becher, R., Karlsson, S., Morisbak, E., & Dahl, J. E. (2008). HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dental Materials*, 24(1), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.08.006>
106. Sancakli, H. S., Yildiz, E., Bayrak, I., & Ozel, S. (2014). Effect of different adhesive strategies on the post-operative sensitivity of class I composite restorations. *European Journal of Dentistry*, 08(01), 015–022. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.126234>
107. Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K., Tachino, H., Tachida, K., & Kubono, K. (2005). Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(4), 297–300. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-0627-8>
108. Saxena, P., Pant, A., Gupta, S., & Pant, V. (2012). Release and toxicity of dental resin composite. *Toxicology International*, 19(3), 225. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.103652>
109. Schafer, T. E., Lapp, C. A., Hanes, C. M., Lewis, J. B., Wataha, J. C., & Schuster, G. S. (1999). Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(3), 192–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990605\)45:3<192::AID-JBM5>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990605)45:3<192::AID-JBM5>3.0.CO;2-A)
110. Schmalz, G., Schuster, U., Koch, A., & Schweikl, H. (2002). Cytotoxicity of Low pH Dentin-Bonding Agents in a Dentin Barrier Test In Vitro. *Journal of Endodontics*, 28(3), 188–192. <https://doi.org/10.1097/00004770-200203000-00011>
111. Şengün, A., Yalçın, M., Ülker, H. E., Öztürk, B., & Hakkı, S. S. (2011). Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112(3), e83–e88. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.02.023>

112. Sezinando, A. (2014). Looking for the ideal adhesive – A review. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 55(4), 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.rpemd.2014.07.004>
113. Sezinando, A., Luque-Martinez, I., Muñoz, M. A., Reis, A., Loguercio, A. D., & Perdigão, J. (2015). Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dental Materials*, 31(10), e236–e246. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.07.002>
114. Shirawachi, S., Takeda, K., Naruse, T., Takahasi, Y., Nakanishi, J., Shindo, S., & Shiba, H. (2022). Oxidative stress impairs the calcification ability of human dental pulp cells. *BMC Oral Health*, 22(1), 437. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02467-w>
115. Sideridou, I., Tserki, V., & Papanastasiou, G. (2002). Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 23(8), 1819–1829. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00308-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00308-8)
116. Söderholm, K.-J., & Mariotti, A. (1999). BIS-GMA–BASED RESINS IN DENTISTRY: ARE THEY SAFE? The Journal of the American Dental Association, 130(2), 201–209. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1999.0169>
117. Spagnuolo, G., Galler, K., Schmalz, G., Cosentino, C., Rengo, S., & Schweikl, H. (2004). Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Amplifies TEGDMA-induced Apoptosis in Primary Human Pulp Cells. *Journal of Dental Research*, 83(9), 703–707. <https://doi.org/10.1177/154405910408300909>
118. Spahl, W., Budzikiewicz, H., & Geurtsen, W. (1998). Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Dentistry*, 26(2), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(96\)00086-3](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(96)00086-3)
119. Stanislawski, L., Lefeuvre, M., Bourd, K., Soheili-Majd, E., Goldberg, M., & Périanin, A. (2003). TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species: ROS and TEGDMA Toxicity in Fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(3), 476–482. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10600>

120. Swift, E. J., Perdigão, J., & Heymann, H. O. (1995). Bonding to enamel and dentin: A brief history and state of the art, 1995. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 26(2), 95–110.
121. Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2001). Aggressiveness of contemporary self-etching systems. *Dental Materials*, 17(4), 296–308. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(00\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(00)00087-7)
122. Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2003). Have dentin adhesives become too hydrophilic? *Journal (Canadian Dental Association)*, 69(11), 726–731.
123. Tjäderhane, L. (2015). Dentin Bonding: Can We Make it Last? *Operative Dentistry*, 40(1), 4–18. <https://doi.org/10.2341/14-095-BL>
124. Tuncer, S., Demirci, M., Schweikl, H., Erguven, M., Bilir, A., & Kara Tuncer, A. (2012). Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clinical Oral Investigations*, 16(6), 1635–1646. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0669-x>
125. Unemori, M., Matsuya, Y., Akashi, A., Goto, Y., & Akamine, A. (2004). Self-etching adhesives and postoperative sensitivity. *American Journal of Dentistry*, 17(3), 191–195.
126. Van Dijken, J. W. V. (2010). Durability of resin composite restorations in high C-factor cavities: A 12-year follow-up. *Journal of Dentistry*, 38(6), 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.02.007>
127. Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Peumans, M., Yoshida, Y., Poitevin, A., Coutinho, E., Suzuki, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2007). Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 28(26), 3757–3785. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.044>
128. Van Meerbeek, B., Inokoshi, S., Braem, M., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1992). Morphological Aspects of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone with Different Dentin Adhesive Systems. *Journal of Dental Research*, 71(8), 1530–1540. <https://doi.org/10.1177/00220345920710081301>
129. Van Meerbeek, B., Vargas, M., Inoue, S., Yoshida, Y., Peumans, M., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2001). Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Operative dentistry*, 26, 119-144.
130. Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003). Buonocore

- memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative dentistry*, 28(3), 215–235.
131. Van Meerbeek, B., Peumans, M., Poitevin, A., Mine, A., Van Ende, A., Neves, A., & De Munck, J. (2010). Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental Materials*, 26(2), e100–e121. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.148>
 132. Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., J., D. M., & K.L., V. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.023>
 133. Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Van Landuyt, K., Yoshida, Y., & Peumans, M. (2020). From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *The journal of adhesive dentistry*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>
 134. Vasconcelos E Cruz, J. (2020). Propriedades físico-químicas, mecânicas e citotóxicas de um novo sistema adesivo dentário contendo um dendímetro (Publicação No. 101496397) [Tese de Douturamento, Universidade do Porto]. Repositório Aberto da Universidade do Porto.
 135. Vasconcelos E Cruz, J., Brito, J., Polido, M., & Gonçalves, L. L. (2019). A new experimental adhesive system containing G-IEMA – physicochemical properties. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 33(4), 418–432. <https://doi.org/10.1080/01694243.2018.1539154>
 136. Vasconcelos E Cruz, J., Delgado, A. H. S., Félix, S., Brito, J., Gonçalves, L., & Polido, M. (2022). Improving Properties of an Experimental Universal Adhesive by Adding a Multifunctional Dendrimer (G-IEMA): Bond Strength and Nanoleakage Evaluation. *Polymers*, 14(7), 1462. <https://doi.org/10.3390/polym14071462>
 137. Vasconcelos E Cruz, J., Polido, M., Brito, J., & Gonçalves, L. L. (2020). Dentin Bonding and SEM Analysis of a New Experimental Universal Adhesive System Containing a Dendrimer. *Polymers*, 12(2), 461. <https://doi.org/10.3390/polym12020461>

138. Wang, Y., & Spencer, P. (2005). Continuing Etching of an All-in-One Adhesive in Wet Dentin Tubules. *Journal of Dental Research*, 84(4), 350–354. <https://doi.org/10.1177/154405910508400411>
139. Wawrzyńkiewicz, A., Rozpedek-Kaminska, W., Galita, G., Lukomska-Szymanska, M., Lapinska, B., Sokolowski, J., & Majsterek, I. (2020). The Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Dental Universal Adhesives—An In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3950. <https://doi.org/10.3390/ijms21113950>
140. Wegehaupt, F. J., Lunghi, N., Belibasakis, G. N., & Attin, T. (2017). Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. *BMC Oral Health*, 17(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0239-3>
141. Welshons, W. V., Nagel, S. C., & Vom Saal, F. S. (2006). Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology*, 147(6), s56–s69. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1159>
142. Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
143. World Health Organization. (2022). Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. World Health Organization.
144. Yan, W., Diao, S., & Fan, Z. (2021). The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the function regulation of the mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02194-z>
145. Yano, J., Kitamura, C., Nishihara, T., Tokuda, M., Washio, A., Chen, K.-K., & Terashita, M. (2011). Apoptosis and survivability of human dental pulp cells under exposure to Bis-GMA. *Journal of Applied Oral Science*, 19(3), 218–222. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572011000300007>
146. Yiu, C. K. Y., Pashley, E. L., Hiraishi, N., King, N. M., Goracci, C., Ferrari, M., Carvalho, R. M., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2005). Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials*, 26(34), 6863–6872. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.011>

147. Yoshida, K., & Greener, E. H. (1994). Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. *Journal of Dentistry*, 22(5), 296–299. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90064-7)
148. Yoshihara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Okihara, T., De Munck, J., Maruo, Y., Nishigawa, G., Minagi, S., Osaka, A., & Van Meerbeek, B. (2013). Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. *Dental Materials*, 29(8), 888–897. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.05.006>
149. Yu, B., Liu, F., & He, J. (2014). Preparation of low shrinkage methacrylate-based resin system without Bisphenol A structure by using a synthesized dendritic macromer (G-IEMA). *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 35, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.03.012>
150. Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology*, 19(3), 124–128. <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>

Anexos

Anexo 1: Carta de aprovação da Comissão de Ética Egas Moniz



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

Comissão de Ética EGAS MONIZ

Proc. Interno nº 1211
PT-286/22

Ex.mo Senhor
Diogo de Carvalho Magalhães

Monte de Caparica, 30 de março de 2023.

Ex.mo Senhor,

Em resposta ao Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado: **"Estudo in vitro da citotoxicidade de um adesivo experimental com G-HEMA"**, foi aprovado.

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica
2829-511 Caparica