

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS RESTAURADORES BIOATIVOS

Trabalho submetido por
Gaëtan Dallée
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO DA BIOCMPATIBILIDADE DE MATERIAIS RESTAURADORES BIOATIVOS

Trabalho submetido por
Gaëtan Dallée
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

e coorientado por
Prof. Doutora Inês Carpinteiro

junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que estiveram presentes e que me ajudaram a realizar este trabalho.

À minha orientadora da tese, Professora Doutora Isabel Barahona, por toda a sua ajuda e apoio ao longo do último ano e toda a disponibilidade. E também por ensinar e partilhar o saber sobre as células e as pesquisas laboratoriais. Foi um prazer de trabalhar consigo.

À minha coorientadora, Professora Doutora Inês Carpinteiro pela ajuda e participação na escolha dos materiais.

Ao Professor Doutor Paulo Mascarenhas, pelo ensino e colaboração na realização das estatísticas. E em geral ao corpo docente da Faculdade Egas Moniz.

Aos meus pais, sem os quais nada teria sido possível. Pelo apoio e por acreditarem em mim sem nenhuma falhas, por me incentivarem sempre a ir mais longe e me motivarem a dar o melhor de mim e por me terem ensinado o gosto pela excelência que, com trabalho árduo, nada é impossível.

Ao meu irmão, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio e motivação para ler cada vez mais livros e com quem partilho os melhores momentos da minha vida.

À Micaela, e à sua família por me terem dado a conhecer um país incrível, ajudar a integrar-me e a aprender a língua. À Micaela, a pessoa chave no sucesso do meu percurso académico pelo imenso suporte, pela motivação para nunca desistir e sobretudo ajudar-me a superar os meus limites.

Ao Lahcène, a melhor pessoa que conheci em Portugal, que, durante 5 anos, partilhou comigo aventuras, cada vez mais incríveis umas que outras. Pelo apoio que demos um ao outro ao longo destes longos e difíceis estudos, com quem partilhei a melhor dupla da clínica. Box 25 para sempre. “Amitiés” à Sra. Hatimi que faz os melhores pastelarias.

RESUMO

Introdução: A reabilitação de um dente parcialmente fraturado ou cariado deve implicar a utilização de um material de restauração. Todos os anos vários novos materiais aparecem no mercado. De facto, a última novidade são os materiais bioativos. Os estudos de biocompatibilidade destes materiais são raros ou inexistentes na literatura científica. A importância da realização de testes de biocompatibilidade é garantir a segurança destes novos materiais na prática clínica.

Objetivo: O objetivo deste estudo é avaliar o nível de citotoxicidade *in vitro* de diferentes materiais bioativos em fibroblastos de rato 3T3. Os materiais bioativos estudados foram o Activa BioActive Restorative™, que é classificado como um cimento de ionómero de vidro modificado por resina, e o Cention Forte®, que se assemelha a um compósito. Em paralelo, foram testados dois materiais como referência de classe similar, o Photac Fil Quick Aplicap™ e o Filtek Z250™ respetivamente.

Métodos: Para realizar este estudo, os materiais foram preparados seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Os materiais foram colocados durante 24 horas e 1 semana em meio de cultura celular, a fim de obter extratos. Foram utilizadas várias concentrações de 100%, 75%, 50%, 25% e 10% dos extratos para avaliar o efeito nos fibroblastos.

Resultados: Os resultados dos testes MTT mostram que os extratos concentrados de resinas 100% e 75%, do Activa e as concentrações de 100%, 75% e 50% dos extratos do Photac e do Cention induzem uma diminuição da viabilidade celular. Apenas o Filtek Z 250 não apresentou citotoxicidade, mesmo nas concentrações mais elevadas.

Conclusão: Os extratos concentrados de resinas testados de Activa, Photac e Cention são citotóxicos, nas concentrações mais elevadas, provavelmente devido aos constituintes libertados e/ou alterações do pH do meio. Apenas o Filtek Z250 apresentou resultados que o qualificam como biocompatível com todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: Citotoxicidade; restauração; bioativo; fibroblastos

ABSTRACT

Introduction: The rehabilitation of a partially fractured or decayed tooth must involve the use of a restorative material. Every year several new materials have appeared on the market. In fact, the latest novelty is bioactive materials. Biocompatibility studies of these materials are rare or non-existent in the scientific literature. The importance of performing biocompatibility tests is to ensure the safety of these new materials in clinical practice.

Objective: The aim of this study was to evaluate the in vitro cytotoxicity level of different bioactive materials in 3T3 mouse fibroblasts. The bioactive materials studied were Activa BioActive Restorative™, which is classified as a resin-modified glass ionomer cement, and Cention Forte®, which resembles a composite. In parallel, two materials were tested as reference materials of similar class, Filtek Z250™ and Photac Fil Quick Aplicap™.

Methods: To conduct this study, the materials were prepared strictly following the manufacturer's instructions. The materials were placed for 24 hours and 1 week in a volume of cell culture medium to obtain extracts. Various concentrations of 100%, 75%, 50%, 25% and 10% of the extracts were used to evaluate the effect on fibroblasts.

Results: Preliminary results of the MTT test show that the concentrated extracts of 100% and 75% resins, Activa and the 100%, 75% and 50% concentrations of Photac and Cention extracts induce a decrease in cell viability. Only Filtek Z 250 did not show cytotoxicity, even at the highest concentrations.

Conclusion: The tested concentrated resin extracts of Ativa, Photac and Cention are cytotoxic, probably due to released constituents and/or pH changes of the medium. Only Filtek Z250 showed results that qualify it as biocompatible.

Keywords: Cytotoxicity; restoration; bioactive; fibroblasts

RÉSUMÉ

Introduction: La réhabilitation d'une dent partiellement fracturée ou cariée passe obligatoirement par l'utilisation d'un matériau de restauration. Chaque année, plusieurs nouveaux matériaux sont apparus sur le marché. En fait, la dernière nouveauté est constituée par les matériaux bioactifs. Les études de biocompatibilité de ces matériaux sont rares ou inexistantes dans la littérature scientifique. L'importance de réaliser des tests de biocompatibilité est d'assurer la sécurité des matériaux dans la pratique clinique.

Objectif: Le but de cette étude était d'évaluer le niveau de cytotoxicité in vitro de différents matériaux bioactifs sur des fibroblastes de souris 3T3. Les matériaux bioactifs étudiés étaient Activa BioActive Restorative™, qui est classé comme un ciment verre ionomère modifié par de la résine, et Cention Forte®, qui ressemble à un composite. En parallèle, deux matériaux ont été testés comme matériaux de référence de classe similaire, Filtek Z250™ et Photac Fil Quick Aplicap™.

Méthodes: Les matériaux ont été placés pendant 24 heures et 1 semaine dans un volume de milieu de culture cellulaire pour obtenir des extraits. Différentes concentrations de 100 %, 75 %, 50 %, 25 % et 10 % des extraits ont été utilisées pour évaluer l'effet sur les fibroblastes.

Résultats: Les résultats préliminaires du test MTT montrent que les extraits concentrés des résines à 100% et 75%, Activa et les concentrations 100%, 75% et 50% des extraits Photac et Cention induisent une diminution de la viabilité cellulaire. Seul Filtek Z 250 n'a pas montré de cytotoxicité, même aux concentrations les plus élevées.

Conclusion: Les extraits de résine concentrés d'Ativa, de Photac et de Cention testés sont cytotoxiques, probablement en raison des constituants libérés et/ou des changements de pH du milieu. Seul le Filtek Z250 a montré des résultats qui le qualifient de biocompatible.

Mots clés: Cytotoxicité; restauration ; bioactif ; fibroblastes

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	15
1. MATERIAIS RESTAURADORES	17
1.1 Resina composta	18
1.2 Cimento de ionómero de vidro (CIV).....	20
1.3 Cimento ionómero de vidro modificado por resina (CIVMR).....	21
1.4 Bioatividade dos materiais restauradores	22
1.5 Interação dos materiais restauradores com o órgão dentário e o periodonto	24
2. ESTUDO DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	26
2.1 Ensaio com o MTT	28
3. OBJETIVO.....	29
4. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS.....	29
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1. MATERIAIS	31
1.1 Materiais restauradores.....	31
1.2 Tipo Celular	33
1.3 Produtos laboratoriais	34
1.4 Utensílios laboratoriais	35
2. MÉTODOS.....	35
2.1 Manipulação dos materiais restauradores.....	36
2.2 Manipulação das células 3T3	37
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
III. RESULTADOS	45
1. Ensaio de MTT utilizando extratos dos materiais restauradores incubados	
durante 24 horas	45
2. Ensaio de MTT utilizando extratos dos materiais restauradores incubados	
durante 1 semana.....	53
IV. DISCUSSÃO	61

V. CONCLUSÃO.....	67
VI. BIBLIOGRAFIA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das monómeros das resinas compostas (Tiu et al., 2021).

Figura 2. Redução do tetrazolio MTT em formazan pela enzima das células viáveis (Buranaamnuay, 2021).

Figura 3. a) Activa Bioactive Restorative™ – Pulpdent®; b) Cention Forte® - Ivoclar Vivadent®; c) Photac Fil Quick Aplicap™ – 3M ESPE; d) Filtek Z250™ – 3M ESPE

Figura 4. Células 3T3 confluentes observadas ao MO a x20 e x40.

Figura 5. Fotografia dos 16 cilindros em 4ml de DMEM. De esquerda para direita, Photac, Cention Forte, Activa Bioactive, Filtek Z250.

Figura 6. Imagem da camara de Neubauer. Fotografia da camara de Neubauer com as células 3T3 no MO a 10x.

Figura 7. Fotografia de duas placas de 96 poços após o ensaio de MTT, em que as células foram expostas aos vários extratos de 24 horas dos diferentes materiais.

Figura 8. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 1º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Figura 9. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 2º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Figura 10. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 1º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Figura 11. Media das percentagens da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, dos 3 ensaios de MTT, expostos a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte®

Figura 12. Fotografia de uma placa de 96 poços após o ensaio de MTT, em que as células foram expostas aos vários extratos de 1 semana dos diferentes materiais.

Figura 13. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 1º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 1

semana incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Figura 14. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 1º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 1 semana incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Figura 15. Preparação dos extratos, em que os cilindros de material restaurador ficam submerso em DMEM e incubados durante 24h ou 1 dia. Observam-se diferenças na cor do meio de cultura das células que fica mais amarelo com o aumento de acidez.

Figura 16. Media das percentagens da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, dos 2 ensaios de MTT, expostos a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 1 semana incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte®

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tabela das características dos materiais utilizados neste presente trabalho.

Tabela 2. Reagentes biológicos utilizados no presente estudo.

Tabela 3. Equipamentos laboratoriais utilizados.

Tabela 4. Diluições dos materiais para obter extratos.

Tabela 5. Valores de absorvência a 595 nm do 1º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 24 horas de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

Tabela 6. Valores de absorvência a 595 nm do 2º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 24 horas de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

Tabela 7. Valores de absorvência a 595 nm do 3º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 24 horas de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

Tabela 8. Média das percentagens de viabilidade celular dos fibroblastos em contacto com diferentes quantidades dos extratos dos materiais do ensaio após 24h.

Tabela 9. Valores de absorvência a 595 nm do 1º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 1 semana de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

Tabela 10. Valores de absorvência a 595 nm do 2º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 1 semana de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

Tabela 11. Média das percentagens de viabilidade celular dos fibroblastos em contacto com diferentes quantidades dos extratos dos materiais após 1 semana.

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3 – Células 3T3 NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)

A – Activa Bioactive Restorative™

Bis-GMA – Bisfenol A-Metacrilato de Glicídica

C – Cention Forte®

CBS – Soro Bovino do inglês *Calf Bovine Serum Gold*

CIV – Cimento de ionómero de vidro

CIVMR - Cimento de ionómero de vidro modificado por resina

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

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

F – Filtek Z250™

HEMA – Hidroxietil Metacrilato

ISO – *International Organization Standardization*

MO – Microscópio Óptico Invertido

MSDS - Material Safety Data Sheet

MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

MTT - Brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

P – Photac Fil Quick Aplicap™

PBS - *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

pH - Potencial de hidrogénio

RC – Resina Composta

TEGDMA - Trietileno Glicol Dimetacrilato

UDMA - Uretano Dimetacrilato

UV - Ultravioleta

XTT - (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida)

I. INTRODUÇÃO

A reabilitação de um dente que se encontra em parte fraturado ou cariado deve passar pela utilização de um material restaurador para manter a função mastigatória, a estética e uma boa oclusão. A danificação permanente do dente, quer seja por traumatismo, ou por lesão de cárie deve ser tratado com materiais restauradores, após limpeza seguida pelo preenchimento da cavidade com a intenção de não deixar expostos os tecidos vitais do dente, restabelecer a anatomia e a função do dente (Rasines Alcaraz *et al.*, 2014).

Inicialmente, o material de eleição era a amalgama sobretudo para os molares e pré-molares. No entanto, com o aumento dos conhecimentos científicos e a importância crescente da biocompatibilidade, algumas perguntas surgiram nomeadamente sobre o efeito da libertação de mercúrio na boca e no ambiente (Rasines Alcaraz *et al.*, 2014), o que levou ao seu desuso. Atualmente, nos casos de restaurações diretas, os materiais mais utilizados são as resinas compostas e os cimentos de ionómero de vidro (Francois *et al.*, 2020). Hoje em dia, existem diversas resinas disponíveis para reabilitar os dentes. A vontade de utilizações cada vez mais rápidas e mais fáceis conduziu ao desenvolvimento de materiais inovadores no mercado. De facto, a última introdução, foram os materiais bioativos que vão combinar a força dos compósitos e as vantagens dos ionómeros de vidro (Lardani *et al.*, 2022).

A ideia subjacente à criação de materiais de restauração bioativos era a de que as restaurações diretas deveriam não só ser utilizadas para reparar lesões nos tecidos duros dentários, mas também ter características biológicas que inibem o crescimento de cáries secundárias sem ter um impacto desfavorável nas células hospedeiras (Wuersching *et al.*, 2023).

Todos os anos, mundialmente são realizados mais de 500 milhões de restaurações dentárias, com interações diretas ou indiretas dos materiais utilizados na dentina ou na polpa. A progressão dos testes *in vitro* e *in vivo*, permitiu obter efeitos e avaliar a interação entre os materiais restauradores, o órgão dentário e o periodonto (Franca *et al.*, 2022).

Os materiais restauradores, vão substituir uma parte integrante do dente, e vão estar em contacto íntimo com os tecidos periodontais e os tecidos pulpares dos dentes ao longo do tempo. Os materiais podem causar efeitos adversos presumivelmente devido à libertação de alguns constituintes químicos libertados. É verdade que os compostos químicos constituintes e os produtos da sua degradação podem-se libertar na boca devido a uma má polimerização. Os mesmos podem então atingir a polpa, o que fundamenta a preocupação sobre a existência de propagação de produtos no sangue através dos capilares e a possibilidade deles atingirem vários órgãos como o cérebro. A importância de realizar testes de biocompatibilidade é essencial para garantir a maior inocuidade possível desses novos materiais na prática clínica. Os materiais bioativos apareceram nos últimos anos e, os estudos de biocompatibilidade são raros ou inexistentes na literatura científica (Remadi, 2020; St. John, 2007).

Um maior conhecimento da biocompatibilidade, nomeadamente da citotoxicidade, e das características físicas e químicas dos materiais restauradores é essencial para dispor de um enquadramento científico para as práticas clínicas seguras para os tecidos orais (Shahi *et al.*, 2019).

A ideia de biocompatibilidade baseia-se na capacidade de um material interagir adequadamente com as estruturas biológicas, ou seja, sem causar uma reação tóxica ou imunológica. A capacidade de um determinado material ou dispositivo ser compatível com um tecido ou organismo vivo tem sido frequentemente definida como biocompatibilidade. Em termos gerais, um material é considerado biocompatível quando o seu contacto com o hospedeiro não resulta em efeitos desfavoráveis, incluindo stress oxidativo, danos no DNA, mutagénese ou apoptose celular (Kus-liśkiewicz *et al.*, 2021).

Para determinar a biocompatibilidade dos materiais, é essencial realizar testes *in vitro*, e especificamente os testes de citotoxicidade.

A citotoxicidade refere-se normalmente aos efeitos prejudiciais induzidos numa determinada linha celular, após exposição a um determinado material. Assim, antes dos estudos *in vivo*, a citotoxicidade é normalmente avaliada inicialmente, efetuando ensaios *in vitro* específicos. Esses ensaios permitem determinar se os materiais que queremos utilizar têm efeitos citotóxicos diretos ou impacto no crescimento celular (Adan *et al.*, 2016; Kus-liśkiewicz *et al.*, 2021).

1. MATERIAIS RESTAURADORES

Hoje em dia, temos acesso a uma imensa variedade de materiais para restaurar os dentes, tal como a amalgama, compósitos, ionómero de vidro, ionómero de vidro modificado por resina e os compómeros (Innes *et al.*, 2015).

A necessidade de avaliar e monitorizar a segurança dos materiais dentários utilizados frequentemente em medicina dentária tem aumentado nas últimas décadas, e faz parte de um processo complexo e moroso. Os materiais dentários serão mais estáveis e terão uma vida útil mais longa se forem passivos e não reagirem ao ambiente da boca. Prevê-se que os materiais dentários amplamente aceites não danifiquem ou prejudiquem as estruturas circundantes da cavidade oral. Isto adota uma posição totalmente negativa relativamente à tolerância e biocompatibilidade dos materiais e oculta a possibilidade de alguns ganhos potenciais e melhoria na sua composição para erradicar a sua potencial citotoxicidade (Mallineni *et al.*, 2013).

A amálgama foi o material preferido para restaurações de dentes posteriores durante várias décadas. No entanto, o mercúrio liberado pelas amálgamas representa uma ameaça tanto para o doente quanto para o ambiente, o que levou à busca de outros tipos de materiais. É com esta ideia que foi necessário encontrar outros materiais para restaurações dentárias (Rasines Alcaraz *et al.*, 2014).

Com a evolução desses materiais, aperfeiçoaram-se produtos utilizados rotineiramente, que são cada vez mais fáceis de manobrar e com um tempo de presa cada vez mais curto, mais agradáveis para o profissional e para o paciente, em que a biocompatibilidade deve ser a palavra-chave na escolha dos materiais.

1.1 Resina composta

Os compósitos têm sido amplamente utilizados com sucesso na prática odontológica. As resinas são muitas polivalentes e são os produtos mais utilizados para restaurações definitivas ou temporárias. Eles podem ser usados para fazer coroas, *inlays* e *onlays*, bases cavitárias, selantes de fissuras, cimentação, selamento endodôntico e muito mais (Ferracane, 2011).

As resinas compostas (RC) são os materiais mais adequados para atingirem os objetivos de alta durabilidade e boa aparência, preservando os dentes que sofreram lesões de cárie e restaurando a sua função e aparência. As resinas devem ter propriedades mecânicas semelhantes às do esmalte e da dentina porque vão permanecer na cavidade oral por um período de tempo prolongado (Kusgoz *et al.*, 2011).

As questões sobre a biocompatibilidade dos materiais não se limitam aos componentes da amálgama. Uma vez que são cada vez mais utilizados na rotina do médico dentista, os materiais à base de resina, são necessárias avaliações científicas sobre os efeitos destes materiais, nomeadamente os mais recentes, nos sistemas biológicos. Uma má polimerização dos monómeros e o desgaste das resinas permitem que os compostos tóxicos (principalmente monómeros) sejam libertados no organismo. Como resultado, as resinas não podem ser consideradas como totalmente inertes no ambiente oral, ou seja, a sua biocompatibilidade pode não ser a ideal (Schmalz & Widbiller, 2022; Van Landuyt *et al.*, 2011).

As resinas compostas são formadas por uma matriz polimérica orgânica composta de metacrilatos e partículas de carga inorgânicas unidas por silano, um agente de união. As resinas compostas também contêm um sistema iniciador e regulador das reações de polimerização e aditivos (Anusavice *et al.*, 2013).

Bowen sintetizou o BisGMA, bisfenol glicidil metacrilato A, e obteve a sua patente em 1962 (Peutzfeldt, 1997). A sua massa molar elevada e a sua rigidez molecular limitam a contração que ocorre durante a polimerização. No entanto, devido às ligações de hidrogénio formadas entre as funções álcool, este monómero tem uma viscosidade demasiado elevada.

Foster e Walker desenvolveram o monómero UDMA, uretano dimetacrilato (Peutzfeldt, 1997), que é utilizado sozinho ou em conjunto com outros monómeros. A sua massa molar é semelhante à do BisGMA, mas como a sua estrutura é mais flexível do que a do BisGMA, a resistência do polímero resultante aumenta. O UDMA tem uma viscosidade muito mais baixa e uma reatividade mais elevada, como resultado, há menos monómeros livres no final da polimerização. O hidroxietil metacrilato (HEMA) e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) também são utilizados, para tornar o BisGMA mais fluido e melhorar o seu uso na clínica. No mercado, existem várias resinas com várias combinações de monómeros dependendo dos fabricantes (Chaput & Faure, 2019; Peutzfeldt, 1997).

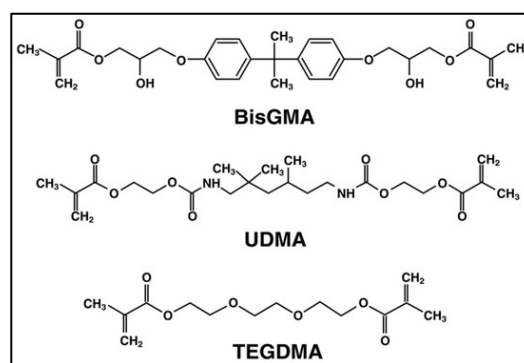


Figura 1. Estrutura química das monómeros das resinas compostas (Tiu *et al.*, 2021).

A luz é o agente que ativa a polimerização da maioria dos compósitos. As canforoquinonas, aceleradas por aminas terciárias, são o sistema iniciador mais comum. Devido a absorção de energia do espectro visível da luz, as canforoquinonas iniciam a reação de polimerização, que é catalisada pelas aminas terciárias.

Para iniciar a polimerização, as resinas fotopolimerizáveis precisam de ser expostas à luz visível azul, que corresponde ao comprimento de onda utilizado pelas canforoquinonas (Ferracane, 2011).

Como resultado, os monómeros, que são moléculas de baixo peso molecular, formam ligações covalentes dando origem a um polímero através de uma reação de fotopolimerização. Esta reação de polimerização, ou seja, de passagem do estado de monómero para o estado de polímero não ocorre de maneira completa. Alguns monómeros residuais não se juntam ao polímero, ficam sem ligações e vão estar livres no ambiente oral (Shahi *et al.*, 2019).

Além disso, os monómeros de metacrilato livres presentes na cavidade bucal ou na polpa, resultantes de um processo de polimerização incompleto durante o cisalhamento mecânico, podem ser libertados para a circulação sistêmica (Cengiz *et al.*, 2022).

Há uma dinâmica específica, em que a qualidade da polimerização vai resultar numa diferença do grau de citotoxicidade das resinas compostas. Quanto maior for o número de monómero que passam a fazer parte do polímero, menor será o potencial tóxico do produto e *vice-versa*. Do ponto de vista da biocompatibilidade, a polimerização dos monómeros é uma etapa chave para o uso seguro dos materiais (Schmalz & Widbiller, 2022).

1.2 Cimento de ionómero de vidro (CIV)

Wilson e Kent são os inventores dos cimentos de ionómero de vidro. Desde então, este material tem sido amplamente utilizado como bases, revestimentos, materiais de restauração e cimentos de cimentação (S. Chen *et al.*, 2016).

Os cimentos de ionómeros de vidro fazem parte dos materiais restauradores com as melhores características biológicas, embora se saiba que nenhum material é totalmente biocompatível (Freire *et al.*, 2015).

O material é produzido por uma reação ácido-base entre um pó contendo partículas de vidro e um líquido contendo ácidos. Os componentes básicos das partículas de vidro incluem o óxido de silício, o óxido de alumínio e o fluoreto de cálcio. O grupo dos ácidos é constituído por ácido maleico, ácido tricarboxílico, ácido itacónico e ácido poliacrílico. Além disso, contém ácido tartárico para aumentar o tempo de trabalho do ionómero de vidro (Anusavice *et al.*, 2013).

A presa dos cimentos de ionómeros de vidro começa com o ataque dos prótons do ácido poliacrílico provocando a dissolução do composto vítreo, e a libertação de íons de alumínio, cálcio, flúor e sódio. O cálcio forma uma ligação cruzada com os grupos carboxilo do ácido poliacrílico, dado que estes compostos migram para a fase aquosa do cimento (Anusavice *et al.*, 2013).

A presença de fluoreto no composto vítreo permite que ele se ligue aos iões hidroxilo da hidroxiapatita, o que leva ao efeito anticariogénico. A libertação gradual de iões fluoreto fornecidos por este constituinte, dura anos após a sua colocação (de Moraes *et al.*, 2015).

A água é necessária para a formação deste material, pois a reação entre os seus componentes apenas pode ocorrer em um meio aquoso, permitindo a ocorrência de uma reação ácido-base. No entanto, quando há uma quantidade significativa de água, os iões metálicos são diluídos, o que resulta em um trabalho restaurador opaco, frágil e mole (Lohbauer, 2010).

1.3 Cimento ionómero de vidro modificado por resina (CIVMR)

Devido às desvantagens dos cimentos de ionómeros de vidro tradicionais, como a sua sensibilidade à água em demasia e a sua fraca dureza inicial, adicionaram-se resinas para melhorar as suas propriedades químicas e físicas (Francois *et al.*, 2020).

O metacrilato e o ácido poliacrílico combinados produziram os CIVMR. A principal diferença da sua constituição em relação aos cimentos de ionómero de vidro tradicionais é que eles também sofrem polimerização, além da reação ácido-base. Isso ocorre porque eles incorporam iniciadores e monómeros necessários para a reação de polimerização (Khoroushi & Keshani, 2013).

Os CIVMR geralmente consistem em 80% dos componentes dos cimentos de ionómeros de vidro tradicionais, ácido poliacrílico e vidro de fluoroaminosilicato, embora isso possa variar. Por outro lado, os 20% restantes são compostos por metacrilatos fotopolimerizáveis (Hamama *et al.*, 2014).

A presença de monómeros da polimerização, como a do hidroxietil-metacrilato (HEMA), na composição dos CIVMR não altera apenas a reação ácido-base dos cimentos de ionómeros de vidro tradicionais, mas também melhora as propriedades físicas dos CIVMR (Khoroushi & Keshani, 2013).

A tomada de preza do CIVMR é precedida por uma reação de ácido-base semelhante aos cimentos de ionómeros de vidro tradicionais e uma polimerização da resina HEMA.

Como resultado, o CIVMR conecta-se ao dente por meio de dois mecanismos diferentes. Primeiro, ele liga os grupos carboxilo aos íons cálcio do dente e, em seguida, liga o componente resinoso ao dente que já foi condicionado por meio de um mecanismo de adesão micromecânica (Hamama *et al.*, 2014).

Além disso, o CIVMR tem potencial antimicrobiano. A liberação de íons metálicos e flúor, bem como seu pH inicial baixo, são as principais causas deste potencial antimicrobiano (Farrugia & Camilleri, 2015).

1.4 Bioatividade dos materiais restauradores

Atualmente, desenvolveram-se materiais dentários com comportamentos diferentes, passando de biomateriais passivos que não deveriam ter efeitos nem negativos nem positivos no organismo para materiais bioativos que têm efeitos positivos constantes e previsíveis, como por exemplo a estimulação das células e a uma ação antibacteriana (Ladino *et al.*, 2021).

Um conjunto crescente de investigações sobre métodos de prevenção de lesões cariosas centra-se na utilização de materiais bioativos para restaurações dentárias. Atualmente, o foco está na criação de materiais dentários que possam impedir a formação de biofilmes e promover a mineralização dos dentes. Foi demonstrada a capacidade dos materiais de resina bioativa em perturbar os consórcios polimicrobianos *in vivo* e prolongar a vida das restaurações (Melo *et al.*, 2022).

A remineralização ou inibição da desmineralização dentária pode ser facilitada por uma série de materiais de restauração dentária bioativos. Estes compostos remineralizantes incluem cimentos de ionómero de vidro, agentes de ligação, compósitos de resina, cimentos de resina, materiais de proteção pulpar contendo flúor ou cálcio e selantes (L. Chen *et al.*, 2013).

Uma substância bioativa deve ser e ter as seguintes características: biocompatibilidade, esterilidade, não ser reabsorvível, atividade bactericida e bacteriostática, manutenção da vitalidade pulpar, estimulação da dentina reparadora, capacidade adesiva, radiopacidade, resistência à compressão e à tração, interação com o meio húmido e facilidade de manipulação (Zhang *et al.*, 2017).

O uso de materiais bioativos em dentisteria restauradora tem beneficiado muito a durabilidade das restaurações, a estimulação celular para a reparação da dentina, o aumento da resistência adesiva, a diminuição da recorrência da cavidade e a diminuição da microfiltração bacteriana. Muitas áreas da medicina dentária restauradora utilizam materiais bioativos, gerando interações diretas entre o substrato e a remineralização, iniciando a precipitação e a troca iónica que encorajam o desenvolvimento de uma camada de hidroxiapatita (Ladino *et al.*, 2021).

Os materiais bioativos, são materiais que estimulam uma reação biológica no contacto do material com o tecido, criando uma união entre eles. A libertação de iões de cálcio, sódio, sílica e fosfato, que resultam em efeitos como a angiogénese e a atividade antibacteriana, foi geralmente comprovada como sendo promovida por materiais bioativos (Benetti, 2019).

Podemos classificar os materiais bioativos em duas categorias. Aqueles cujas reações rápidas à superfície resultam em indução e produção. E também aqueles cuja indução de respostas celulares e extracelulares resulta na ligação da substância tanto aos tecidos duros como aos tecidos moles. No segundo caso, apenas a condução ocorre como resultado de uma reação de superfície retardada que apenas provoca uma resposta extracelular (Ladino *et al.*, 2021).

Os tecidos dentários estão constantemente a trocar iões de flúor, cálcio e fosfato, o que cria um equilíbrio graças à função reguladora da saliva. A cavidade oral tem um ambiente dinâmico onde os materiais de restauração e os tecidos dentários estão expostos a uma vasta gama de variações em termos de pH, temperatura, microrganismos e nutrientes (Garchitorena, 2019).

Ao adicionar cargas bioativas ou ao aderir monómeros antibacterianos à sua fase orgânica, as resinas compostas podem ser modificadas para produzir bioatividade, criando um mecanismo antibacteriano e remineralizante (Vallittu *et al.*, 2018).

Os cimentos ionómeros de vidro foram uns dos primeiros materiais ditos "inteligentes" devido às suas propriedades que lhe permitem libertar iões de flúor, que favorecem a reparação dentinária. A libertação de flúor aumenta os ácidos, realizando um efeito tampão no meio onde se encontram, que também contém iões fluoreto de alumínio e fluoreto de hidrogénio, que se concentram na sua fase de dissolução e gelificação, mas diminuem no seu endurecimento e maturação (Tjäderhane & Tezvergil-Mutluay, 2019).

1.5 Interação dos materiais restauradores com o órgão dentário e o periodonto

Os materiais restauradores são produtos que servem para substituir uma parte importante do dente e que podem permanecer em contato íntimo com os tecidos periodontais e pulpares dos dentes por um longo período de tempo. Devido à libertação dos seus componentes químicos, os materiais podem ter efeitos negativos sobre os tecidos adjacentes. O tipo de material, o local onde é utilizado e a utilização pretendida afetam o grau de biocompatibilidade do material. Por conseguinte, um material pode não ser totalmente biocompatível, mas ainda assim pode produzir uma resposta tecidular adequada quando testado num determinado tipo de tecido ou grupo de tecidos em circunstâncias específicas (St. John, 2007).

Não existe um material restaurador totalmente seguro para uso na cavidade oral. O critério de escolha assume que os benefícios do uso devem superar amplamente os riscos associados. Muitos materiais têm componentes que podem ser tóxicos ou irritantes, o que significa que nenhum deles é totalmente inerte em termos biológicos. Idealmente, os materiais restauradores são inodoros, não tóxicos, nem irritantes. Isso significa que são inofensivos para a cavidade oral e que não se dissolvem na saliva ou qualquer outro fluido ingerido (Remadi, 2020).

O tipo celular predominante no tecido do periodonto conectivo são os fibroblastos, que remodelam a matriz extracelular através das fibras de colagénio. Eles também respondem a várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, que regulam o equilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz extracelular. O epitélio e o tecido conectivo subjacente compõem o periodonto. A gengiva inserida e a gengiva marginal livre têm epitélio escamoso estratificado queratinizado. O sulco gengival e a gengiva aderida são locais onde a inflamação gengival e, eventualmente, doenças periodontais podem surgir. A formação de bolsas periodontais e recessão gengival é iniciada pela degradação de colagénio na junção dento-epitelial (Borzangy *et al.*, 2013).

Os materiais dentários tal como os microrganismos e seus compostos tóxicos, quando aplicados nos tecidos dentinários e no complexo pulpar podem libertar componentes citopáticos que penetram nos túbulos dentinários para induzir danos pulpares (Siqueira *et al.*, 2015).

Os materiais dentários têm um impacto biológico importante quando em contato com tecidos vivos e quando são libertadas substâncias químicas específicas. Por exemplo, a amálgama liberta quantidades relativamente pequenas de mercúrio. Por outro lado, os compósitos libertam uma grande variedade de compostos, incluindo monómeros como o bis-GMA, UDMA, TEGDMA e HEMA, catalisadores, aceleradores e outros resíduos como o bisfenol A. Estão a ser feitas cada vez mais investigações sobre os impactos biológicos da libertação das nanopartículas e dos químicos dos materiais dentários. De facto, as nanopartículas são incorporadas propositadamente nos compósitos para melhorar qualidades como o brilho. Por outro lado, também podem ser produzidas pela moagem de partículas de carga maior e entrar acidentalmente nos materiais. Adicionalmente, mesmo que o material não contenha inicialmente quaisquer nanopartículas, o dentista cria nanopartículas durante o polimento ou remoção das restaurações (Schmalz & Widbiller, 2022).

Além disso, os monómeros residuais dos materiais resinosos irritam os tecidos periodontais, causando necrose, inflamação e recessão gengival em redor dos dentes. De facto, os monómeros que não foram polimerizados afetam a biocompatibilidade dos materiais resinosos, aumentando os seus níveis de citotoxicidade. Em consequência, vamos estar a frente de danos químicos locais, hipersensibilidade, inflamação da mucosa, vesículas, úlceras e, eventualmente, reações alérgicas sistémicas mais graves (Moharamzadeh *et al.*, 2009).

Tanto os pacientes, como os profissionais de medicina dentária que utilizam produtos à base de resina, como as resinas compostas, podem ter reações alérgicas (Mallineni *et al.*, 2013).

Os cimentos ionómeros de vidro, apresentam uma série de inconvenientes, incluindo um grau de fragilidade elevado e sensibilidade à humidade nas fases iniciais de fixação, o que pode potenciar a difusão de compostos nos tecidos adjacentes (S. Chen *et al.*, 2016).

2. ESTUDO DE BIOCAMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade, como referido anteriormente, define-se como a capacidade de um material funcional utilizado numa determinada aplicação induzir uma reação favorável no hospedeiro. Essa definição também abrange o risco biológico, que inclui a probabilidade de que respostas desfavoráveis a dispositivos médicos ou materiais tenham um impacto negativo na saúde, que deve ser o mais baixo possível (Crawford *et al.*, 2021).

No âmbito da dentisteria e da reabilitação do dente numa aplicação clínica ideal, a biocompatibilidade é uma qualidade biológica crucial. Preferencialmente, um material de restauração dentária tanto como os seus produtos de degradação não devem provocar reações nocivas ou alérgicas enquanto desempenham a função pretendida (Zafar *et al.*, 2020).

Dado que a maioria dos materiais dentários entram em contacto com os tecidos orais durante um período de tempo prolongado, a biocompatibilidade é uma questão importante.

Embora clara, a definição não incluía recomendações sobre como avaliar a biocompatibilidade ou sugestões sobre como reforçar ou melhorar a biocompatibilidade. É aqui que entram os estudos de citotoxicidade *in vitro*, são a fase inicial da avaliação da biocompatibilidade dos materiais dentários. Para tal, podem ser utilizados testes de contacto direto com as células ou ensaios de contacto indireto, em que é estabelecida uma barreira entre as células e os materiais a testar (Bapat *et al.*, 2021; Crawford *et al.*, 2021).

Atualmente, os testes são definidos pela ISO para determinar a biocompatibilidade de dispositivos e materiais.

As normas ISO examinam os perfis toxicológicos dos materiais devido à sua importância crítica no cumprimento dos requisitos regulamentares para estudos de biocompatibilidade pré-comercialização. A série ISO 10993 inclui orientações para a seleção de técnicas adequadas para avaliar a toxicidade do equipamento médico, incluindo materiais dentários. A biocompatibilidade pode ser avaliada por três métodos diferentes: *in vitro*, usando culturas de células, *in vivo*, usando experiências em animais e posteriormente usando os ensaios clínicos. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, tal como acontece com outros produtos químicos, são o primeiro passo na avaliação dos materiais dentários para determinar a sua possível toxicidade. Para a avaliação biológica de materiais, é fundamental a conceção experimental da interface entre as células e o material. Esta interação pode ser direta, indireta ou por diluição do extrato do material. Nas experiências de contacto direto com as células, a substância é aplicada diretamente sobre as células em culturas de monocamadas e são geradas curvas de dose-resposta após vários tempos de incubação. No entanto, como as células do corpo nem sempre estão em contacto direto com os materiais, os ensaios de contacto indireto foram desenvolvidos com uma barreira entre as células e as substâncias a testar (Shahi *et al.*, 2019).

O contacto entre os materiais não solúveis e as culturas celulares pode ser estabelecido através da utilização de um agente emulsionante, como o meio de cultura celular, o DMSO ou o etanol, em que o material entra em contacto com estes agentes, libertando compostos tóxicos, e depois o extrato libertado entra em contacto com as células (Moharamzadeh *et al.*, 2009).

Geralmente, o número de células saudáveis não expostas ao material a testar é utilizado para quantificar a viabilidade celular. Os mesmos ensaios utilizados para detetar a viabilidade são frequentemente realizados ao longo do tempo para investigar a proliferação celular numa população. As abordagens da viabilidade celular podem ser realizadas com vários ensaios e podem examinar populações inteiras ou somente células individuais. Em geral, a análise da população é mais rápida, mas produz resultados menos pormenorizados do que os que envolvem medidas de viabilidade ao nível de uma única célula. As análises são efetuadas com a ajuda de corante, como é o caso do MTT, azul de tripan, XTT, MTS, cristal violeta e vão mesmo até técnicas mais complexas, como é o caso do RAMAN de análise individual (Stoddart, 2011).

2.1 Ensaio com o MTT

O teste de redução do MTT desenvolvido pela primeira vez por Mossman em 1983, é um método de contagem rápido de células viáveis.

O ensaio MTT continua a ser um dos ensaios de viabilidade mais úteis e apreciados, que se baseia na conversão de um substrato em produto cromogénico realizada pelas células vivas. O ensaio utiliza a redutase mitocondrial, succinato desidrogenase, para transformar o sal de tetrazolio de cor amarelo solúvel em água, MTT, [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] num precipitado purpura insolúvel, o formazan. O MTT pode atravessar a membrana celular devido aos seus grupos laterais lipofílicos, sendo reduzido somente nas células vivas por uma enzima mitocondrial ou do plasma celular.

Em seguida, são utilizados solventes orgânicos para dissolver e solubilizar os cristais de formazan de cor púrpura obtidos posteriormente numa placa de 96 poços. A concentração do formazan é então avaliada por densidade óptica a 570 nm (Kumar *et al.*, 2018; Präbst *et al.*, 2017).

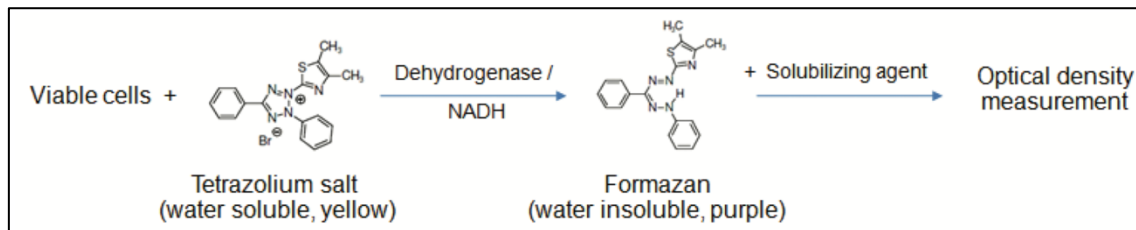


Figura 2. Redução do tetrazolium MTT em formazan pela enzima das células viáveis (Buranaamnuay, 2021).

Uma vez que a intensidade da cor do formazan está correlacionada com a quantidade de células metabolicamente ativas e viáveis, quanto maior for o número de cristais obtidos, maior será o valor de absorvência. Este teste permite estimar a viabilidade de diferentes tipos de células (Buranaamnuay, 2021).

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar o nível de citotoxicidade de dois materiais restauradores bioativos e compará-la com a dos materiais do mesmo tipo que não são bioativos. As investigações decorreram *in vitro*, utilizando fibroblastos 3T3 de ratinho que é uma linha celular muito estável. Os materiais estudados foram o Activa Bioactive Restorative™ e Photac Fil Quick Aplicap™, que se classificam como cimentos de ionómero de vidro modificados por resina e o Cention Forte® e Filtek Z250™ que se classificam como compósitos.

4. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

A hipótese nula deste trabalho corresponde a não haver diferenças de citotoxicidade dos materiais bioativos, Activa e Cention, em relação aos materiais do mesmo tipo não bioativos, Photac e Filtek, respetivamente.

A hipótese alternativa corresponde à situação em que há diferenças de citotoxicidade dos materiais bioativos, Activa e Cention, em relação aos materiais não bioativos, Photac e Filtek, respetivamente.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1 Materiais restauradores

No âmbito desta investigação, foram testados dois materiais restauradores bioativos. Esses materiais inscrevem-se na reabilitação direta do dente, o Activa Bioactive Restorative™ – Pulpdent® e o Cention Forte® – Ivoclar Vivadent®.

Em paralelo dois materiais restauradores conhecidos, cientificamente validados e amplamente usados na rotina dos médicos dentistas foram testados para comparação: a resina composta Filtek Z250™ – 3M™ ESPE que se assemelha ao Cention Forte® e o Photac Fil Quick Aplicap™ – 3M™ ESPE que é um ionómero de vidro modificado por resina fotopolimerizável que se assemelha ao Activa Bioactive Restorative™.



Figura 3. a) Activa Bioactive Restorative™ – Pulpdent®; b) Cention Forte® - Ivoclar Vivadent®; c) Photac Fil Quick Aplicap™ – 3M ESPE; d) Filtek Z250™ – 3M ESPE

Todos os materiais foram preparados seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Para todos os materiais foi utilizado um molde de forma a uniformizar as amostras, permitindo a produção de cilindros idênticos de 4mm de altura e 4mm de diâmetro com uma espátula angulada e um brunidor esférico esterilizados no autoclave. Para o PhotacTM e o Cention Forte[®], necessitámos de misturar o material com um vibrador. No caso do Activa BioactiveTM, as pontas de auto-mistura são fornecidas. Todos os materiais foram polimerizados com um fotopolimerizador UV DB 686 (Coxo, China).

Tabela 1. Tabela das características dos materiais utilizados neste presente trabalho.

Nome do produto	Fabricante	Lote	Cor	Ingredientes*	Tempo de mistura	Intensidade da luz	Tempo de luz	Indicações
Activa Bioactive RestorativeTM	Pulpdent [®]	230119	A2	Mistura de diuretano e outros metacrilatos com ácido poliacrílico modificado, Sílica amorfa Fluoreto de sódio		550-1000 mW/cm ²	20 seg	Cavidades das superfícies radiculares e restaurações de classe I, II, III, IV e V sem envolvimento pulpar
Cention Forte[®]	Ivoclar Vivadent [®]	Z04TPL	A2	Vidro de fluorossilicato de Ca, vidro de silicato de Ba-Al, vidro de fluorossilicato de Ca-Ba-Al, UDMA, trifluoreto de itérbio, UDMA alifático aromático, DCP e PEG-400-DMA.	15 seg entre 22 e 26°C 4000 - 4800 oscilações/min	500-900 mW/cm ²	20 seg	Restaurações diretas anteriores e posteriores classes I, II e V nos dentes permanentes e decíduos.
Photac Fil Quick AplicapTM	3M TM ESPE	9647735	A3	Pó de vidro tratado com silano, amina aromática, ácido polimérico, metacrilato (HEMA), água, sal de magnésio metacrilato fosforilado, dimetacrilato de uretano (UDMA), estabilizador	15 seg ± 23°C 4300 oscilações/min	500-900 mW/cm ²	20 seg	Restaurações diretas classes III e V, Pequenas classes I, Defeitos cuneiformes, Obturação de dente de leite, Selagem de fissura, Restaurações temporárias classe I e II
Filtek Z250TM	3M TM ESPE	9496202	A2	Cerâmica tratada com silano, Dimetacrilato de éter diglicidílico de bisfenol A (BISGMA), Dimetacrilato de éter de polietilenoglicol de bisfenol A (BISEMA6), Dimetacrilato de diuretano (UDMA), Dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), Óxido de alumínio, N,N-dimetilbenzocaína		500-900 mW/cm ²	20 seg	Restaurações diretas anteriores e posteriores classe I, II, III, IV e V, Reconstrução coronária, Contenção, Restaurações indiretas incluído <i>inlay</i> , <i>onlays</i> e facetas

*Segundo ficha MSDS de cada produto

1.2 Tipo Celular

No âmbito do trabalho, todas as manipulações laboratoriais foram efetuadas com células 3T3 que são fibroblastos embrionários de ratinhos (NIH/3T3 ATCC® CRL-1658). A principal característica desta linha celular é o seu crescimento e aderência em monocamada.

As células foram inicialmente descobertas e obtidas em 1962 por Georges Todaro e Howard Green na Universidade de Medicina de New York a partir de tecido embrionário de ratinho albino suíço. O nome “3T3” refere-se à “*transferência de 3 dias, inóculo de 3×10^5 células*”. Dessa forma, foi assim estabelecida uma linha celular através deste protocolo a partir de culturas de células primárias de fibroblastos embrionários. Estas células com uma taxa de crescimento padronizada e transformaram-se em linha celular imortalizada, estável, muito utilizada nos trabalhos de pesquisa laboratoriais (Todaro & Green, 1963).

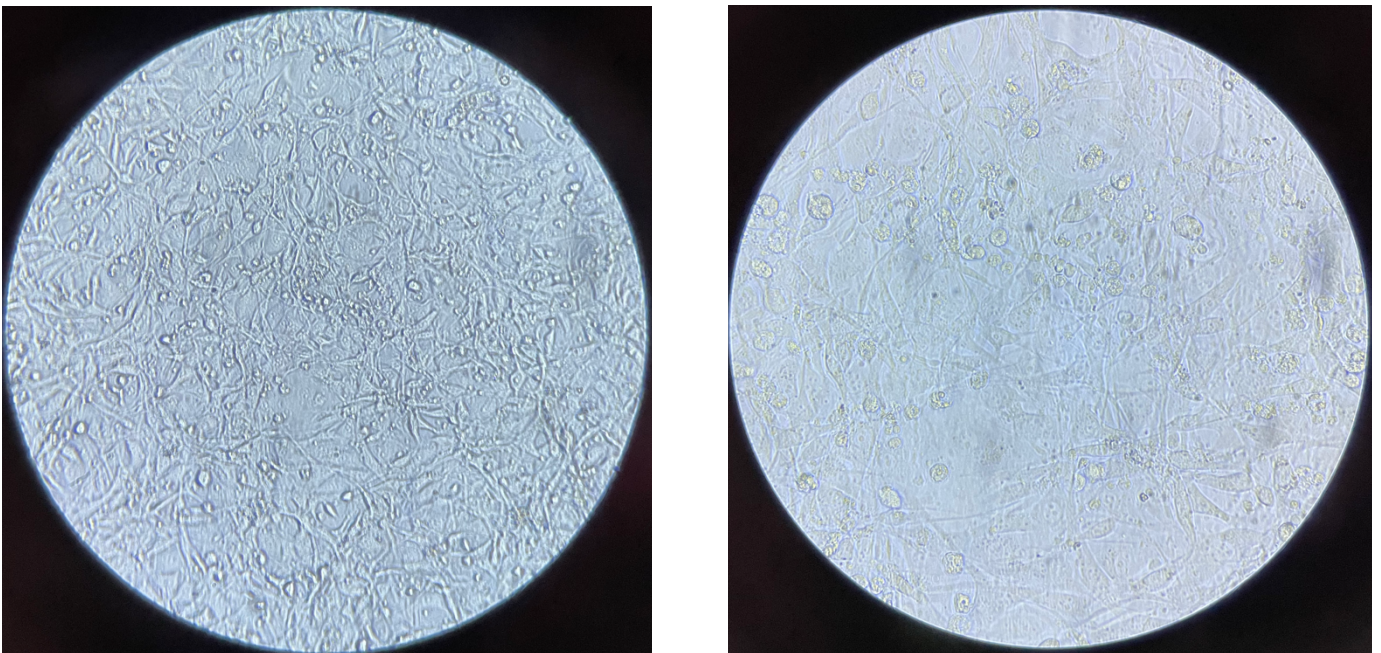


Figura 4. Células 3T3 confluentes observadas ao MO a x20 e x40.

1.3 Produtos laboratoriais

Tabela 2. Reagentes biológicos utilizados no presente estudo.

Produtos	Fonte
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 0,5mg/ml, 99% puro	Sigma, Reino Unido
Dimetilsulfóxido (DMSO), 99%	Sigma, Reino Unido
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) (Meio Eagle Dulbecco modificado), filtrado-esterilizado, testado para endotoxinas	Sigma, Reino Unido
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão-fosfato, PBS) 1xC, pH 6,0-7,0	Gibco, Reino Unido
<i>Calf Bovine Serum Gold</i> (CBS); esterilizado, pH 7,1, testado para endotoxina e hemoglobina	PAA, Áustria
Gentamicina 50mg/ml	Gibco, Reino Unido
Solução <i>Tripan Blue</i> (0,4%) (Azul de tripano), filtrada-esterilizada	Sigma, Reino Unido
Solução de Piruvato de Sódio 100 mM (PNA)	Gibco, Reino Unido
Solução de Anfoterizina B 250 µg/ml (Fungizona), filtrada-esterilizada	Sigma, Reino Unido
Solução L- penicilina-estreptomicina (10000 U/ml Penicilina, 10 mg/ml Estreptomicina), filtrada-esterilizada (pen-strep)	Gibco, Reino Unido
Tripsina de pâncreas suíno 1xC, filtrado-esterilizado, pH 6,4-7,0	Sigma, Reino Unido
Água destilada estéril (autoclavada)	
IGEPAL CA-360	Sigma, Reino Unido
Isopropanol	Sigma, Reino Unido

1.4 Utensílios laboratoriais

Tabela 3. Equipamentos laboratoriais utilizados.

Equipamento e Descartáveis	Marca
Câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2	LaboGene™, Dinamarca
Banho-maria	
Centrífuga modelo 3-16K	Sigma®, Reino Unido
Leitor de microplacas modelo 680	BioRad®, EUA
Estufa incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO ₂ Jacketed	Shal Lab™, EUA
Microscópio óptico	Axiovert® 25, Zeiss, EUA
Câmara de Neubauer modelo 81001104	Hirshmann®, Alemanha
Pipeta Multicanal BPE-300	Labnet International®, EUA
Micropipetas P200 e P1000 e pontas estéreis	Gilson®, EUA
Frascos de cultura de 25cm T25	Sarsted®, Alemanha
Pipetas estéreis descartáveis de 2ml, 5ml, 10ml e 25 ml	DentaLab™, Espanha
Placas de 96 poços	VWR International®, China
Tubos Falcão 15 e 50ml	DentaLab™, Espanha
Criotubos	DentaLab™, Espanha

2. MÉTODOS

Neste estudo foram avaliados os potenciais níveis de citotoxicidade *in vitro* de dois materiais restauradores bioativos e dos seus controlos não bioativos, pelo ensaio de MTT, utilizando diferentes concentrações dos extratos e preparados após 24 horas e com 1 semana de incubação. Todas as manipulações das resinas e das células foram efetuadas no laboratório de Biologia Molecular do CiiEM em condições estéreis, utilizando a câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dinamarca).

2.1 Manipulação dos materiais restauradores

Todos os produtos foram preparados rigorosamente segundo as instruções do fabricante. Cada material foi comprado especificamente para este estudo, e utilizado dentro do prazo de validade.

Os materiais foram preparados de modo em formar cilindros idênticos de 4mm de altura e 4 mm de diâmetro com um molde metálico, correspondendo a uma superfície de exposição total de 75mm². Para cada material a testar, produziram-se 16 cilindros que foram imersos em 4ml de meio de cultura das células (DMEM) num tubo Falcão de 15ml, seguindo assim as proporções recomendadas pela ISO 10993-12. A incubação foi feita numa estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante um período de 24h ou de 7 dias.



Figura 5. Fotografia dos 16 cilindros em 4ml de DMEM. De esquerda para direita, Photac, Cention Forte, Activa Bioactive, Filtek Z250.

A resina composta Filtek Z 250TM, foi preparada com instrumentos estéreis e fotopolimerizada segundo as instruções do fabricante com um fotopolimerizador de 400-500 nm, durante 20 segundos em camada incremental de 2mm.

O ionómero de vidro Photac™, foi ativado, misturado com um vibrador durante 15 segundos, posteriormente os cilindros foram realizados com um aplicador específico em camada de 2mm e finalmente fotopolimerizado durante 20 segundos.

O Activa Bioactive Restorative™, são duas pastas presentes numa seringa que vão se misturar na ponta fornecida pelo fabricante e fazer camadas de 4mm. Este material tem uma polimerização *dual*, ou seja, após colocação o fabricante sugere deixar “autopolimerizar” 20 segundos e só depois induzir a fotopolimerização durante 20 segundos.

Finalmente, o Cention Forte®, foi ativado pressionando a cápsula, agitando durante 15 segundos e logo após fotopolimerizado durante 20 segundos até 4mm.

Nos três últimos materiais temos uma dupla polimerização. De facto, num primeiro tempo, ocorre uma polimerização química com a mistura do pó com um ou dois líquidos e num segundo tempo dá-se a polimerização induzida pela luz. Por último, todos os materiais foram esterilizados durante uns 20 minutos com uma luz UV na camara de fluxo laminar antes de adicionar 4ml de meio de cultura DMEM (Figura 5) e incubar durante 24h ou 7 dias na estufa a 37°C e atmosfera húmida de 5% de CO₂.

2.2 Manipulação das células 3T3

A totalidade das manipulações das células 3T3 foi efetuada na camara de fluxo laminar de forma a respeitar as condições de assepsia e evitar todas as contaminações externas. O meio de cultura que permite o crescimento e o suporte nutricional das células é composto de DMEM, onde foi acrescentado 10% de soro CBS, 1% de piruvato de sódio, 1% de pen-streptomicina e 1% de fungizona.

2.2.1 Descongelamento

Em primeiro lugar, as cerca de 10⁶ células utilizadas de uma terceira passagem (P3) estiveram guardadas em meio DMEM, com 10% de DMSO e 10% de CBS, a uma temperatura de -140°C.

A descongelação ocorreu rapidamente, num banho-maria de 37°C, e foram colocadas em 9 ml de meio de cultura DMEM com toda a suplementação necessária. Logo em seguida, foi realizado uma centrifugação e o sobrenadante descartado para eliminar os produtos em excesso (DMSO e CBS) utilizados durante a criopreservação. O “pellet” de as células foi ressuspensionado e colocado num frasco de cultura T25, ou seja, dentro de 25 cm², com meio DMEM completo. Finalmente, as células ficaram a incubar a 37°C na estufa de CO₂, com atmosfera húmida e 5% de CO₂ (2406 SHELL LAB *Basic CO₂ Jacketed Incubator*, Shel Lab) até atingirem uma elevada densidade, ou seja, a confluência celular.

Diariamente, as células foram observadas até atingirem a confluência, altura em que é necessário descolar as células com tripsina para mudar o meio de cultura e a aumentar a superfície de proliferação para garantir um equilíbrio do pH e aporte nutricional às células. A confluência celular é verificável ao microscópio invertido, através da aderência ao pavimento do frasco e do espaço disponível entre as células que deve ser quase nulo.

2.2.2 Congelação

No momento em que foi atingido o estado de confluência, geralmente após 3 dias, parte das células da cultura celular foram guardadas a -140°C, para manter o stock de células 3T3 para as futuras experiências laboratoriais. Cerca de 10⁶ células foram congeladas em meio de cultura DMEM suplementado com soro bovino (CBS) em que se acrescentou 10% de DMSO e 10% de CBS, permitindo dessa forma uma melhor conservação evitando danificar as células. A congelação é fracionada, inicialmente as células são colocadas no gelo para o transporte até à arca a -80°C, onde a temperatura vai ser diminuindo gradualmente e finalmente são colocadas a -140°C, que corresponde à temperatura de conservação ideal.

2.2.3 Manutenção das células em cultura (Tripsinização)

Para manter as células viáveis durante o período em que os vários ensaios foram feitos é preciso tripsinizar as células, ou seja, é preciso renovar o meio de crescimento e a superfície de adesão, o que equivale a aumentar o número de divisões celulares

(número da passagem) aumentando o risco de introduzir mutações no DNA. Para os ensaios, as células devem ser utilizadas nas passagens entre 5 e 15 para evitar alterações no DNA que poderão influenciar os resultados dos ensaios de viabilidade celular.

Primeiro, as células foram observadas ao microscópio invertido para avaliar o nível de confluência. Quando o nível é aceitável (80%), é removido o meio de cultura do frasco T25 sem possibilidade de perder as células devido as suas propriedades de aderência. As mesmas, são lavadas com 5ml de solução de PBS 1 vez concentrado (tampão fosfato).

De seguida, foi efetuada a etapa chave do procedimento, que consiste em adicionar 1,5ml de uma solução de tripsina-EDTA, permitindo dessa forma, o descolamento das células do fundo do frasco. O descolamento resulta da degradação das proteínas de adesão pela tripsina. Esta reação enzimática decorre na estufa durante 2 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após uma rápida verificação do descolamento ao microscópio, a paragem da reação enzimática é realizada através da adição, de um volume 3 vezes superior ao volume de tripsina, de meio de cultura, ou seja, 4,5ml.

As células foram pipetadas, colocadas num tubo Falcão e centrifugadas num tubo Falcão, durante 7 minutos a 123g. Após remoção do sobrenadante, o pellet de células foi suspenso em 1ml de meio DMEM a fim de realizar a contagem celular.

2.2.4 Contagem celular

Esta etapa, vai quantificar o número de células, o que permite normalizar o número de células a usar em todas as experiências, bem como semear um pequeno número de células para as manter em cultura para as próximas experiências.

A contagem de células em suspensão passa pelo teste de exclusão de corante, ou seja, o *dye exclusion test*, que se baseia sobre a alteração de permeabilidade das membranas celulares entre uma célula viável e uma morta.

De facto, o azul de tripan 0,5 (p/v), um corante que só é capaz de atravessar as membranas de células mortas, permitindo calcular a percentagem de células mortas e vivas. Para essa finalidade, foram recolhidos 10µl de células em suspensão pos-tripsinização e adicionado 10µl de solução de azul de tripan. O número de células foi posteriormente calculado utilizando uma câmara de Neubauer no microscópio invertido, onde foram contadas as células presentes em 3 conjuntos de 16 quadrados da camara. O número de células por mililitro é obtido através da fórmula:

$$N = \frac{\sum n^{\circ} \text{ de células contadas em 3 quadrantes}}{3} \times \text{fatcor de diluição} \times 10^4$$

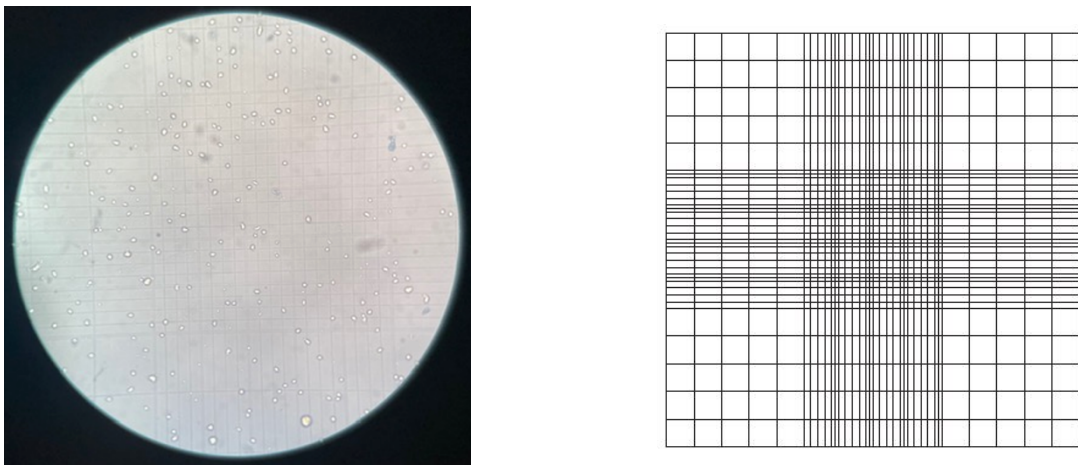


Figura 6. Imagem da camara de Neubauer. Fotografia da camara de Neubauer com as células 3T3 no MO a 10x.

2.2.5 Teste de viabilidade celular MTT

O teste de viabilidade MTT é um método colorimétrico que permite determinar a citotoxicidade dos produtos que pretendemos testar, associada ao número de células viáveis após exposição ao putativo tóxico.

Este método baseia-se na utilização de um sal de tetrazolio amarelo. O mesmo, na presença de uma enzima succinato desidrogenase, da cadeia respiratória mitocondrial, forma um produto, o formazan que possui uma cor violeta. A quantidade de precipitado formado é então proporcional à quantidade de mitocôndrias e, por conseguinte, ao número de células vivas presentes. É então possível medir, por espectrofotometria, a quantidade relativa de células com metabolismo ativo, ou seja, viáveis.

Este ensaio tem sido utilizado para medir *in vitro* a citotoxicidade dos materiais restauradores em contato com as células. A espectrofotometria, vai-nos dar diferentes valores de absorvência dependendo da quantidade de cristais de formazan solubilizados numa solução de 4mM HCl, 0.1% IGEPAL em isopropanol. Com estes valores calcula-se a percentagem de células viáveis em relação aos valores de absorvência obtidos nos controlos em que as células não são expostas a nenhum extrato (100% de viabilidade).

Para determinar a viabilidade celular através deste ensaio, foi semeado uma placa de 96 poços 10^6 células em 200 μ l de meio completo por poço que ficaram a incubar a 37°C em atmosfera húmida e 5% de CO_2 , durante 24h. Após essa etapa, foi retirado o meio e adicionado 200 μ l de extratos em diferentes concentrações. Após 24h, os extratos que estiveram em contacto com as 3T3 foram removidos, as células lavadas com 100 μ l de PBS 1xc para remover a totalidade do extrato potencialmente tóxico. De seguida, foram adicionados 100 μ l da solução de MTT 0,5mg/ml em meio sem soro seguida de uma incubação a 37°C numa atmosfera húmida a 5% de CO_2 . Após 3 horas foi adicionado 1,5 vezes o volume, ou seja, 150 μ l de uma solução de 4mM HCl, 0.1% IGEPAL em isopropanol para solubilizar os cristais formados pela reação enzimática do MTT. Após 1 a 16 horas, a absorvência de cada poço da placa de 96 foi quantificada no leitor de placas Model 680 (Bio-Rad, California) no comprimento de onda de 595nm.

Todos os ensaios experimentais foram realizados 3 vezes de forma independente. Para cada concentração de extrato tivemos 8 replicas idênticas.

Como descrito anteriormente, as células utilizadas estiveram congeladas (-140°C) e quando colocadas em cultura para propagação consideram-se na passagem zero (P0), ou seja, sem nenhuma tripsinização. Após descongelação e várias tripsinizações para permitir o crescimento das células, estabilizá-las e obter um o número suficiente de 3T3, foram realizados os ensaios MTT. Para que os ensaios sejam realizáveis, é necessário obter 10^6 células 3T3 nas passagens entre 2 e 15 para cada placa de 96 poços.

Em paralelo, foram preparados os materiais, ou seja, foram produzidos 16 discos de cada material a testar seguindo rigorosamente as condições descritas pelo fabricante. Os 16 discos foram colocados em tubos Falcão, submersos em 4ml de meio de cultura DMEM e incubados durante 24 horas para o primeiro ensaio e também durante 1 semana para o segundo ensaio.

No dia seguinte, foram feitas as diluições dos extratos em meio de cultura em diferentes proporções permitindo obter extratos com as concentrações de 100%, 75%, 50%, 25% e 10% (ver Tabela 4)

Logo a seguir, foi removido o meio dos poços onde as células estiveram a crescer durante 24 horas e foi substituído por 200µl das diferentes concentrações dos extratos. Foi utilizada uma coluna de 8 poços para cada diluição.

Para cada material, foram utilizadas 5 colunas de 8 poços para as concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10% e uma ou mais colunas de 8 poços para controlo, onde estavam as células 3T3 a crescer em 200µl de meio DMEM unicamente.

As células 3T3 foram expostas durante 24 horas às diferentes concentrações dos extratos. O ensaio de MTT é realizado após lavagem dos 96 poços com PBS e adição de uma solução de 100µl de MTT. Após 3 horas de incubação os cristais foram dissolvidos em 150µl de uma solução de 4mM HCl, 0.1% IGEPAL em isopropanol e os valores de absorvência a 595 nm foram obtidos no espectrofotómetro.

Tabela 4. Diluições dos materiais para obter extratos.

Concentração	Extrato µl	DMEM µl	Volume total µl
100%	200	0	200
75%	150	50	200
50%	100	100	200
25%	50	150	200
10%	20	180	200

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças estatisticamente entre os grupos foram calculadas usando a análise de variância ANOVA. Além disso, o teste de multicomparação de Tukey HSD foi usado para avaliar as variações significativas. Para verificar se havia diferenças em níveis de significância estabelecidos em $p < 0,05$, os grupos foram comparados usando o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para Windows.

III. RESULTADOS

1. Ensaio de MTT utilizando extratos dos materiais restauradores incubados durante 24 horas

O objetivo deste ensaio é avaliar o grau de citotoxicidade dos materiais restauradores bioativos, Activa Bioactive Restorative™ (A) e do Cention Forte® (C) e comparar com os materiais mais comuns, do mesmo tipo, ou seja, o Filtek Z250™ (F) e o Photac Fil Quick Aplicap™ (P), respetivamente.

As células foram expostas durante 24 horas a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25 e 10%) dos vários extratos obtidos por incubação dos materiais, em meio de cultura das células, durante 24 horas. Após esse tempo de exposição foram realizados os ensaios de viabilidade celular, adicionando MTT ao meio de cultura. As células viáveis produzem cristais púrpura de formazan que foram solubilizados numa solução de 4mM HCl, 0.1% IGEPAL em isopropanol, seguindo-se a leitura dos valores de absorvência a 595 nm.

Cada coluna (8 poços nas mesmas condições) de uma placa de 96 poços apresentou cores diferentes consoante a quantidade dos cristais púrpura produzida pelas células viáveis (Figura 7), em que a intensidade da cor púrpura aumenta com o maior número de células viáveis indicando a compatibilidade do material.

O nosso controlo de 100% de viabilidade celular correspondeu às colunas com células de fibroblastos 3T3 não expostas a nenhum tóxico, que apenas estiveram em contato com o meio de cultura até ao momento de adição de MTT.

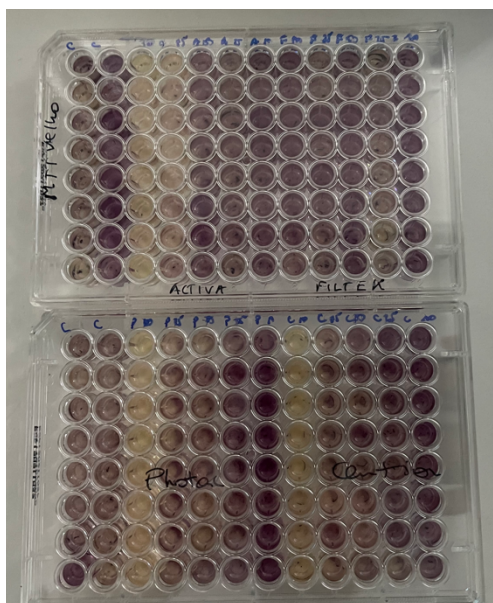


Figura 7. Fotografia de duas placas de 96 poços após o ensaio de MTT, em que as células foram expostas aos vários extratos de 24 horas dos diferentes materiais.

Tabela 5. Valores de absorvência a 595 nm do 1º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 24 horas de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C)

3T3 cells	3T3 cells	A 100	A 75	A 50	A 25	A 10	F 100	F 75	F 50	F 25	F 10
0,473	0,554	0,102	0,100	0,307	0,476	0,505	0,461	0,462	0,573	0,441	0,506
0,340	0,482	0,094	0,149	0,376	0,402	0,485	0,400	0,387	0,427	0,464	0,472
0,380	0,592	0,088	0,167	0,414	0,464	0,534	0,436	0,516	0,495	0,566	0,578
0,389	0,508	0,072	0,096	0,471	0,416	0,498	0,442	0,463	0,532	0,458	0,608
0,440	0,562	0,058	0,076	0,472	0,437	0,454	0,485	0,557	0,549	0,411	0,614
0,438	0,660	0,113	0,140	0,541	0,535	0,415	0,450	0,551	0,536	0,383	0,546
0,438	0,457	0,092	0,188	0,476	0,485	0,444	0,448	0,431	0,481	0,296	0,492
0,414	0,588	0,079	0,222	0,335	0,588	0,464	0,339	0,457	0,466	0,414	0,500

3T3 cells	3T3 cells	P 100	P 75	P 50	P25	P10	C100	C75	C50	C25	C10
0,492	0,589	0,098	0,236	0,285	0,442	0,536	0,149	0,337	0,427	0,607	0,636
0,307	0,443	0,087	0,340	0,496	0,562	0,559	0,104	0,410	0,495	0,568	0,588
0,327	0,453	0,100	0,349	0,430	0,569	0,613	0,124	0,423	0,456	0,556	0,663
0,343	0,458	0,069	0,291	0,508	0,630	0,618	0,108	0,392	0,471	0,494	0,625
0,333	0,583	0,068	0,300	0,525	0,645	0,695	0,140	0,428	0,445	0,512	0,587
0,402	0,527	0,074	0,375	0,480	0,564	0,587	0,185	0,393	0,482	0,604	0,620
0,466	0,425	0,109	0,397	0,421	0,615	0,636	0,234	0,427	0,406	0,666	0,563
0,618	0,504	0,098	0,285	0,498	0,561	0,642	0,158	0,386	0,408	0,375	0,625

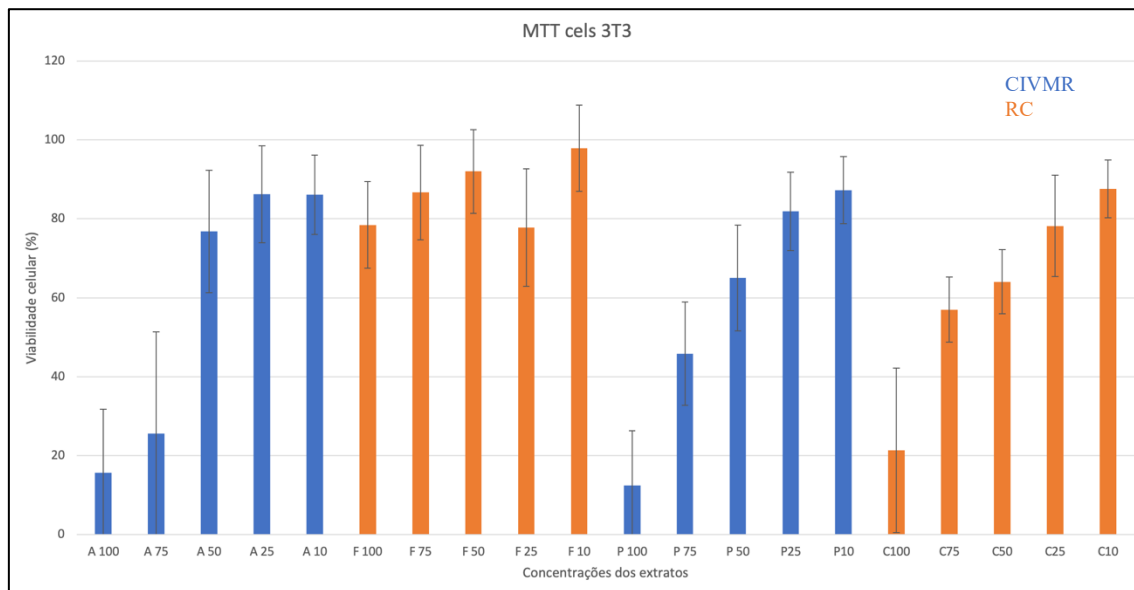


Figura 8. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 1º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Neste primeiro ensaio de MTT com extratos de 24 horas, como podemos ver no gráfico (Figura 8, Tabela 5), observamos uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração dos extratos. Podemos ver que os extratos com as concentrações mais elevadas, ou seja, 100% e 75% têm uma citotoxicidade pronunciada (viabilidade celular abaixo de 70%), nomeadamente para os materiais A, C e P. No caso dos extratos F não se observa aumento de citotoxicidade com o aumento de concentração uma vez que os valores de viabilidade celular são elevados e quase constantes.

Este gráfico mostra que a viabilidade celular é inversamente proporcional à concentração dos extratos de materiais restauradores, exceto para os extratos F.

Tabela 6. Valores de absorvência a 595 nm do 2º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 24 horas de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

3T3 cells	3T3 cells	A 75	A 50	A 25	A 10	3T3 cells	F 75	F 50	F 25	F 10	3T3 cells
0,605	0,537	0,413	0,544	0,683	0,705	0,614	0,629	0,655	0,669	0,646	0,833
0,555	0,516	0,382	0,484	0,583	0,627	0,637	0,524	0,571	0,582	0,622	0,803
0,460	0,467	0,387	0,491	0,663	0,663	0,633	0,612	0,611	0,582	0,646	0,828
0,503	0,530	0,420	0,518	0,570	0,714	0,621	0,561	0,362	0,608	0,679	0,766
0,525	0,559	0,399	0,515	0,545	0,708	0,542	0,586	0,602	0,595	0,704	0,799
0,402	0,582	0,432	0,550	0,646	0,699	0,611	0,595	0,689	0,601	0,722	0,787
0,444	0,595	0,431	0,515	0,595	0,689	0,620	0,597	0,675	0,663	0,754	0,810
0,640	0,600	0,494	0,505	0,640	0,679	0,669	0,579	0,671	0,643	0,743	0,885

3T3 cells	3T3 cells	P 75	P 50	P 25	P 10	3T3 cells	C 75	C 50	C 25	C 10	3T3 cells
0,657	0,820	0,514	0,650	0,616	0,759	0,839	0,280	0,296	0,540	0,736	0,695
0,653	0,613	0,479	0,519	0,598	0,677	0,802	0,327	0,301	0,444	0,659	0,736
0,622	0,631	0,492	0,492	0,667	0,547	0,816	0,426	0,464	0,686	0,687	0,801
0,665	0,705	0,382	0,480	0,598	0,625	0,830	0,401	0,448	0,647	0,746	0,745
0,665	0,713	0,504	0,511	0,692	0,664	0,848	0,436	0,475	0,628	0,767	0,839
0,632	0,588	0,427	0,475	0,628	0,454	0,859	0,427	0,490	0,678	0,795	0,725
0,706	0,695	0,517	0,550	0,712	0,497	0,827	0,450	0,500	0,670	0,792	0,809
0,715	0,583	0,542	0,550	0,668	0,558	0,850	0,440	0,519	0,572	0,778	0,920

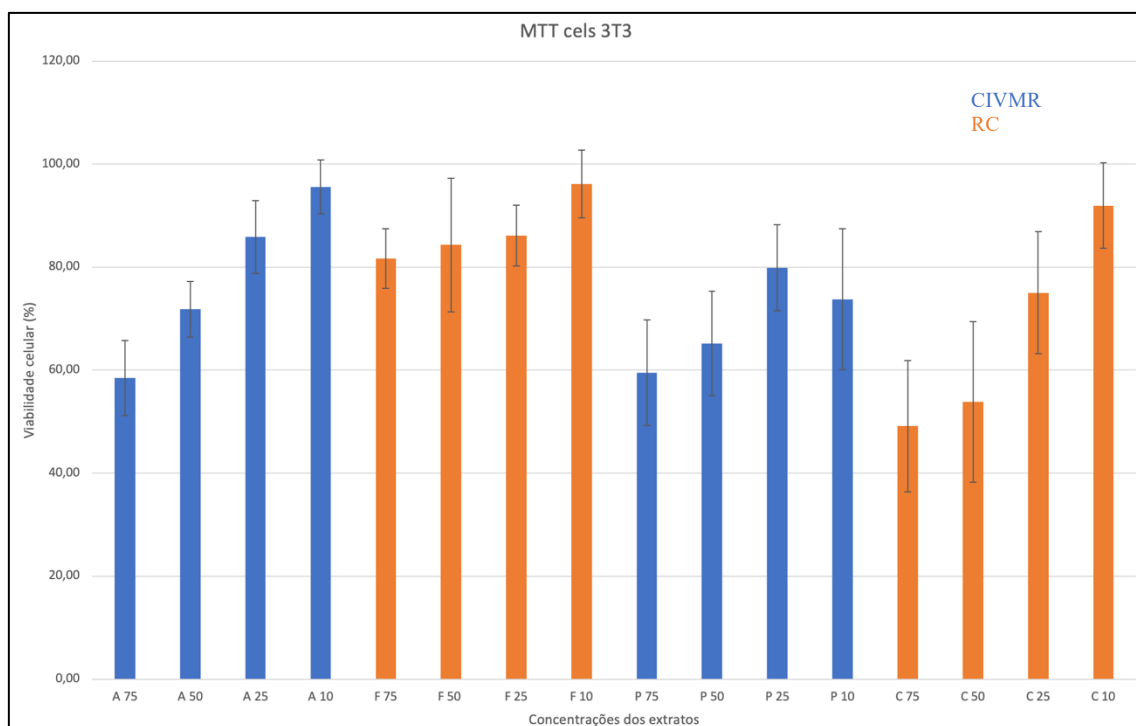


Figura 9. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 2º ensaio de MTT, expostas a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Após os resultados do primeiro os ensaios de MTT com as concentrações de 100% não foram repetidos devido à elevada toxicidade observada com os 3 materiais: A, C e P.

No segundo ensaio obtivemos, sensivelmente, valores de percentagens de viabilidade celular iguais às do 1º ensaio (Figura 9, Tabela 6). Observamos um aumento de viabilidade celular à medida que a concentração dos extratos diminui.

Neste ensaio, o material A não é considerado citotóxico nas concentrações de 50% e inferiores, o C e o P só na concentração de 25% e inferiores não é citotóxico. O material F é biocompatível *in vitro*, mesmo na concentração de extrato mais elevada.

Tabela 7. Valores de absorvência a 595 nm do 3º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 24 horas de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

3T3 cells	3T3 cells	A 75	A 50	A 25	A 10	3T3 cells	F 75	F 50	F 25	F 10	3T3 cells
0,668	0,680	0,391	0,526	0,569	0,630	0,571	0,608	0,608	0,526	0,579	0,749
0,684	0,617	0,391	0,518	0,530	0,697	0,624	0,558	0,548	0,551	0,581	0,708
0,656	0,701	0,418	0,618	0,604	0,717	0,691	0,597	0,578	0,633	0,621	0,765
0,680	0,703	0,447	0,528	0,619	0,704	0,637	0,579	0,568	0,623	0,590	0,708
0,649	0,665	0,478	0,612	0,632	0,689	0,698	0,587	0,570	0,621	0,628	0,760
0,656	0,711	0,521	0,603	0,621	0,667	0,653	0,562	0,558	0,629	0,624	0,760
0,720	0,731	0,433	0,545	0,611	0,657	0,616	0,503	0,552	0,586	0,552	0,755
0,673	0,741	0,490	0,560	0,723	0,726	0,699	0,572	0,606	0,604	0,656	0,795
3T3 cells	3T3 cells	P 75	P 50	P 25	P 10	3T3 cells	C 75	C 50	C 25	C 10	3T3 cells
0,510	0,524	0,294	0,331	0,491	0,563	0,682	0,350	0,311	0,548	0,751	0,847
0,516	0,526	0,277	0,386	0,519	0,558	0,730	0,371	0,329	0,379	0,690	0,807
0,487	0,411	0,313	0,382	0,517	0,615	0,684	0,394	0,418	0,646	0,703	0,730
0,482	0,493	0,316	0,360	0,450	0,594	0,726	0,385	0,455	0,594	0,699	0,745
0,510	0,542	0,305	0,402	0,454	0,566	0,602	0,366	0,392	0,551	0,667	0,708
0,553	0,445	0,275	0,389	0,409	0,526	0,656	0,360	0,412	0,631	0,662	0,748
0,611	0,524	0,309	0,435	0,425	0,531	0,667	0,336	0,395	0,599	0,738	0,783
0,591	0,529	0,316	0,421	0,411	0,596	0,751	0,369	0,376	0,556	0,646	0,881

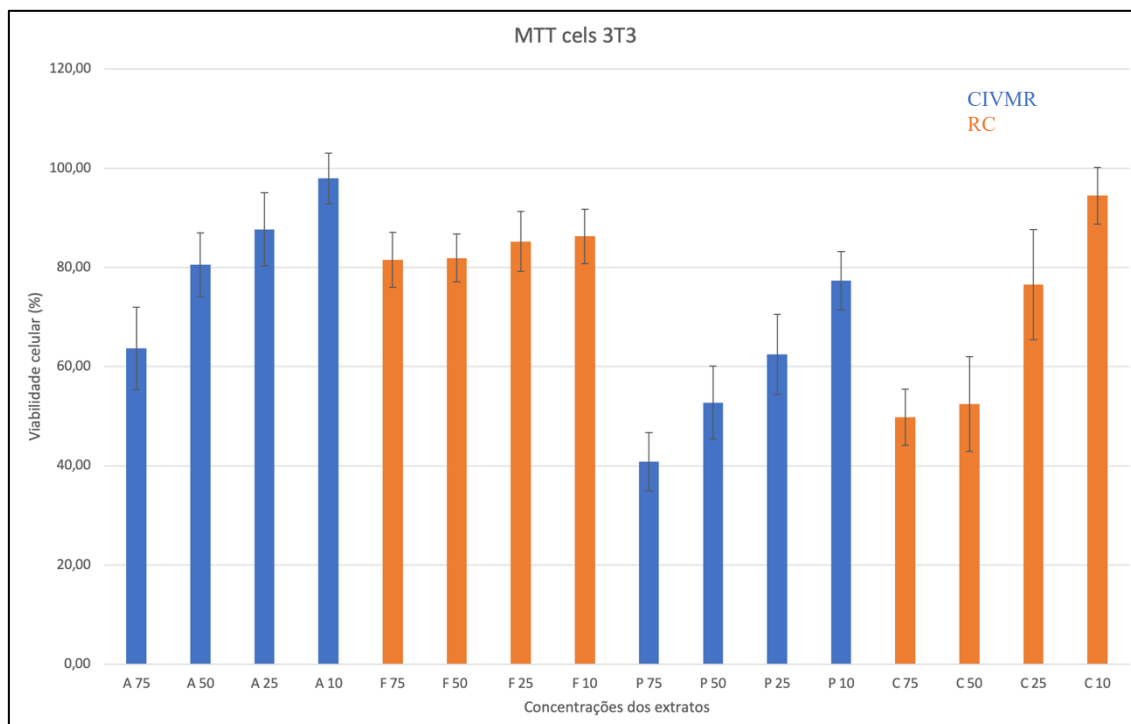


Figura 10. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 3º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

No 3º ensaio MTT confirmámos os resultados obtidos nos ensaios anteriores (Figura 10, Tabela 7). Um aumento da biocompatibilidade, com a diminuição das concentrações dos extratos dos materiais, exceto para o extrato F que é biocompatível em todas as concentrações testadas.

Seguindo a norma ISO, o material A é seguro nas concentrações inferiores a 50%, o P novamente só é seguro na concentração de 10% como no primeiro ensaio e o C é seguro a partir de concentração de 25% ou inferiores. Novamente, o único material com níveis de biocompatibilidade muita elevada é o F com uma viabilidade celular estável, acima dos 80% de viabilidade celular em todas as concentrações testadas.

Tabela 8. Média das percentagens de viabilidade celular dos fibroblastos em contacto com diferentes quantidades dos extratos dos materiais do ensaio após 24h.

	Média das reduções MTT % de viabilidade celular	Média da precisão
A75	49,28	± 13,76
A50	76,39	± 9,09
A25	86,56	± 8,90
A10	93,23	± 6,78
F75	83,26	± 7,75
F50	86,06	± 9,46
F25	83,05	± 8,95
F10	93,42	± 7,67
P75	48,72	± 9,73
P50	60,98	± 10,31
P25	74,75	± 8,76
P10	79,44	± 9,34
C75	51,97	± 8,86
C50	56,78	± 11,09
C25	76,61	± 11, 93
C10	91,35	± 7,10

De acordo com a norma ISO 10993-5, um material considerado não citotóxico e por isso biocompatível quando os níveis de viabilidade celular são iguais ou superiores a 70%.

Então podemos afirmar que:

- O material F é biocompatível em todas as concentrações testadas.
- O material A é biocompatível na concentração de 50% e inferiores.
- O material C é biocompatível na concentração de 25% e inferiores.
- O material P é biocompatível na concentração de 25% e inferiores.

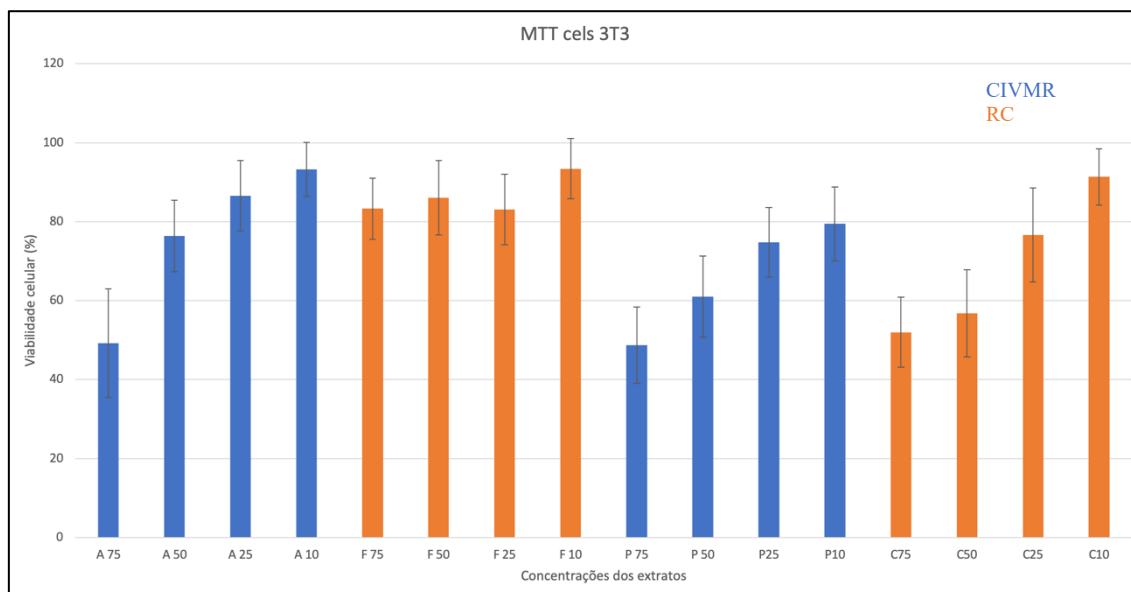


Figura 11. Media das percentagens da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, dos 3 ensaios de MTT, expostos a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 24 horas incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte®

No gráfico da Figura 11, estão representadas as médias das percentagens de viabilidade celular dos 3 ensaios. Podemos ver que:

- Nas concentrações mais elevadas, ou seja, 100 e 75%, não há diferenças significativas de viabilidade celular entre os dois CIVMR, quer bioativo (A) ou não (P), sendo os dois muito citotóxicos. Somente a partir das diluições de 50% e até 10% encontramos diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} < 0,05$) entre os 2 materiais CIVMR, sendo o material bioativo A menos citotóxico.
- Também podemos observar que, nas concentrações 100, 75, 50 e 25%, temos uma diferença significativa ($p\text{-value} < 0,05$) de viabilidade celular entre as resinas compostas (C e F) com vantagem para o material não bioativo (F). Só na concentração testada mais baixa de extrato é que obtivemos resultados parecidos entre estes dois compósitos.

Podemos afirmar após avaliação estatística que P é mais citotóxico do que o material A, diminuindo a citotoxicidade à medida que diluímos o extrato. O material C é também mais citotóxico que o F em quase todas as concentrações.

2. Ensaio de MTT utilizando extratos dos materiais restauradores incubados durante 1 semana

Nestes ensaios de MTT, as células 3T3 foram incubados com extratos de materiais restauradores em que os materiais estiveram a incubar durante 1 semana. O objetivo era saber se um material em contacto com o meio durante mais tempo aumenta a sua citotoxicidade, ou seja, se o fator tempo influencia a biocompatibilidade destes materiais.

Como em todos os ensaios de MTT realizados, as células estiveram em contacto durante 24 horas com os extratos de materiais que como anteriormente foram testados em diferentes concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10%. Após a exposição dos fibroblastos de ratinho aos extratos, foram realizados os ensaios de MTT e, os valores de absorvência foram medidos num espectrofotómetro a 595 nm.

Os poços das placas de 96 apresentaram diferentes intensidades de cor, de acordo com a quantidade de cristais purpura produzidos pelas células viáveis; quanto mais intensa for a cor púrpura mais biocompatível é o material.

O controlo foi representado por células de fibroblastos em contacto com meio sem nenhum extrato durante o mesmo período de tempo, 24 horas, correspondendo a uma viabilidade celular de 100%.

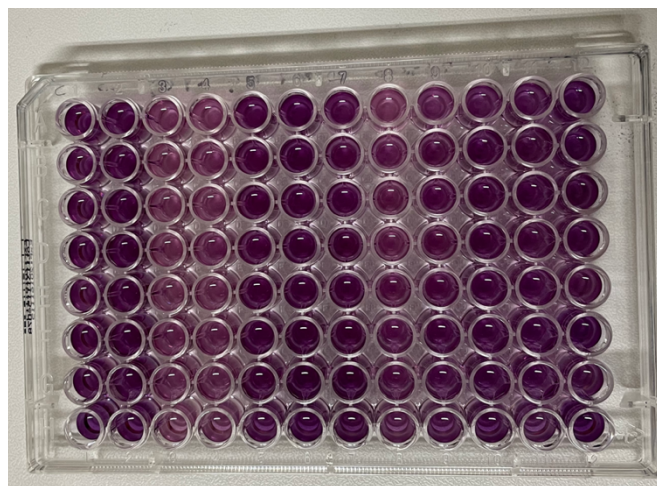


Figura 12. Fotografia de uma placa de 96 poços após o ensaio de MTT, em que as células foram expostas aos vários extratos de 1 semana dos diferentes materiais.

Tabela 9. Valores de absorvência a 595 nm do 1º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 1 semana de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek, Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

3T3 cells	3T3 cells	A 100	A 75	A 50	A 25	A 10	F 100	F 75	F 50	F 25	F 10
0,678	0,591	0,257	0,422	0,536	0,515	0,400	0,313	0,409	0,395	0,495	0,376
0,676	0,622	0,277	0,449	0,604	0,590	0,485	0,439	0,395	0,425	0,432	0,483
0,671	0,710	0,255	0,465	0,597	0,528	0,544	0,341	0,430	0,476	0,373	0,451
0,625	0,683	0,270	0,432	0,539	0,515	0,468	0,347	0,429	0,414	0,292	0,436
0,624	0,605	0,238	0,374	0,433	0,475	0,558	0,330	0,428	0,377	0,240	0,454
0,617	0,655	0,229	0,386	0,398	0,491	0,539	0,370	0,415	0,336	0,205	0,485
0,599	0,659	0,229	0,411	0,443	0,571	0,582	0,362	0,398	0,273	0,264	0,523
0,683	0,627	0,239	0,360	0,460	0,526	0,524	0,345	0,284	0,196	0,162	0,512

3T3 cells	3T3 cells	P 100	P 75	P 50	P25	P10	C100	C75	C50	C25	C10
0,497	0,446	0,212	0,275	0,268	0,435	0,476	0,245	0,380	0,442	0,549	0,561
0,536	0,526	0,237	0,268	0,305	0,483	0,533	0,282	0,369	0,481	0,602	0,509
0,513	0,522	0,269	0,314	0,351	0,441	0,644	0,305	0,437	0,573	0,687	0,562
0,443	0,576	0,270	0,338	0,367	0,495	0,676	0,328	0,424	0,591	0,661	0,564
0,520	0,576	0,313	0,366	0,388	0,504	0,713	0,373	0,501	0,621	0,613	0,624
0,492	0,545	0,287	0,338	0,385	0,510	0,657	0,355	0,417	0,537	0,629	0,640
0,498	0,540	0,301	0,290	0,381	0,565	0,689	0,315	0,441	0,521	0,666	0,623
0,562	0,558	0,267	0,219	0,325	0,477	0,467	0,288	0,399	0,491	0,602	0,625

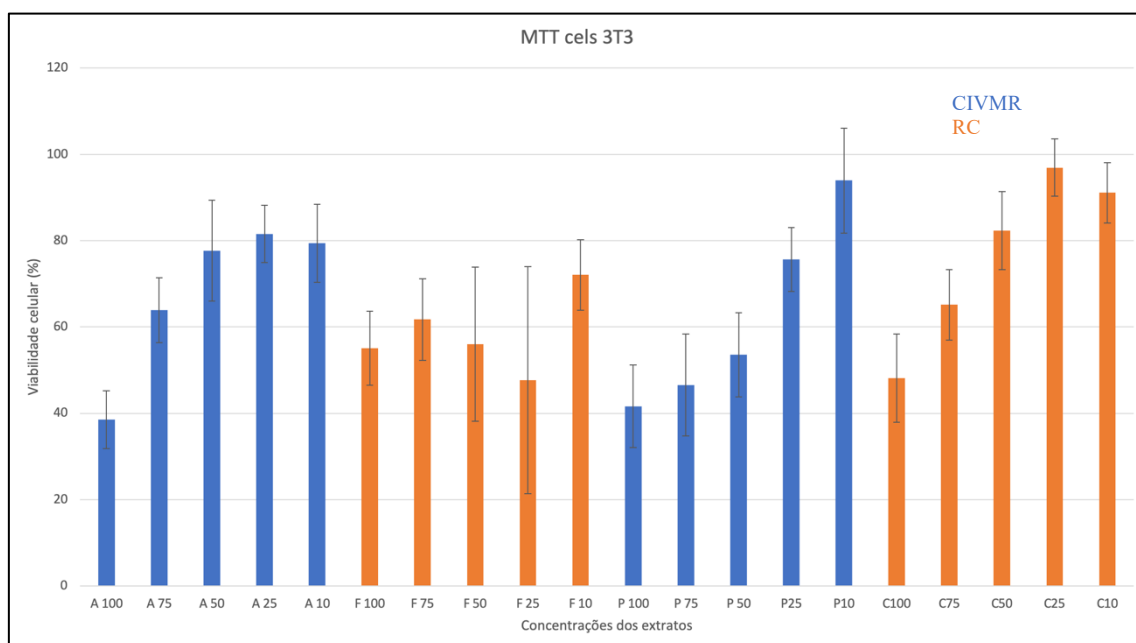


Figura 13. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 1º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (100, 75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 1 semana de Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

Nos gráficos das Figuras 13 e 14 (Tabela 9 e 10), os extratos postos em contato com as células utilizados foram obtidos com os materiais incubados durante 1 semana. Podemos observar a mesma tendência observada com extratos preparados por incubação durante 24 horas, ou seja, um aumento de biocompatibilidade com a diminuição da concentração para todos os materiais exceto o material F.

De facto, observamos que os materiais A e C são biocompatíveis a partir de 50%, valor idêntico ao dos ensaios anteriores. O material P é biocompatível a partir dos 25%

No ensaio de MTT (Figura 13), os extratos F parecem ser citotóxicos em todos as concentrações, no entanto quando repetimos este ensaio (Figura 14), o extrato F foi sempre não citotóxico o que está mais de acordo com os resultados obtidos com extratos de 24 horas.

Tabela 10. Valores de absorvência a 595 nm do 2º ensaio MTT, com fibroblastos de ratinho 3T3 expostos aos diferentes extratos de 1 semana de Activa Bioactive Restorative™ (A), de Filtek Z250™ (F), de Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e de Cention Forte® (C).

3T3 cells	3T3 cells	A 75	A 50	A 25	A 10	3T3 cells	F 75	F 50	F 25	F 10	3T3 cells
0,849	0,731	0,402	0,409	0,741	0,659	0,748	0,614	0,600	0,542	0,586	0,598
0,747	0,767	0,401	0,458	0,650	0,634	0,719	0,617	0,595	0,503	0,548	0,637
0,714	0,672	0,372	0,469	0,646	0,684	0,707	0,637	0,561	0,514	0,571	0,593
0,696	0,650	0,413	0,440	0,659	0,669	0,739	0,510	0,561	0,474	0,489	0,585
0,675	0,701	0,416	0,423	0,611	0,656	0,737	0,587	0,539	0,452	0,569	0,565
0,736	0,729	0,428	0,440	0,789	0,662	0,735	0,598	0,634	0,545	0,611	0,538
0,599	0,586	0,415	0,511	0,631	0,680	0,679	0,597	0,617	0,535	0,592	0,764
0,659	0,704	0,430	0,505	0,496	0,384	0,720	0,587	0,566	0,539	0,486	0,710

3T3 cells	3T3 cells	P 75	P 50	P 25	P 10	3T3 cells	C 75	C 50	C 25	C 10	3T3 cells
0,555	0,561	0,293	0,295	0,553	0,626	0,500	0,290	0,355	0,418	0,414	0,539
0,498	0,625	0,297	0,337	0,594	0,673	0,551	0,399	0,473	0,558	0,466	0,538
0,532	0,662	0,300	0,315	0,649	0,599	0,586	0,397	0,487	0,562	0,514	0,550
0,582	0,672	0,292	0,357	0,554	0,626	0,619	0,367	0,454	0,568	0,461	0,543
0,486	0,625	0,272	0,299	0,614	0,603	0,594	0,411	0,472	0,552	0,501	0,463
0,587	0,690	0,316	0,330	0,617	0,649	0,584	0,391	0,513	0,512	0,532	0,627
0,552	0,658	0,312	0,323	0,588	0,695	0,663	0,419	0,448	0,531	0,511	0,496
0,542	0,566	0,251	0,315	0,504	0,624	0,599	0,392	0,464	0,547	0,416	0,649

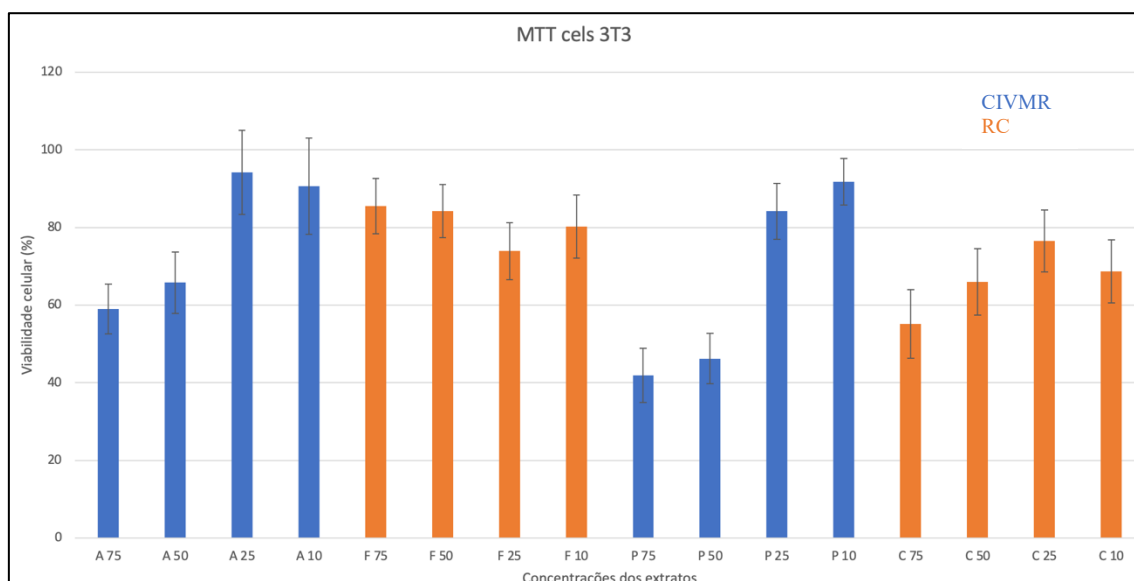


Figura 14. Percentagem da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, do 2º ensaio de MTT, expostos a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 1 semana de Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte® (C).

Todos os ensaios realizados neste trabalho, mostram que, quer sejam utilizados extratos de 24 horas ou de 1 semana, os valores de viabilidade se mantêm ou são ligeiramente superiores aos obtidos com extratos de 24 h. Em termos de biocompatibilidade, o material F é o material mais seguro, depois temos o material A, C e finalmente o P.

A maior toxicidade do material P provavelmente resulta da libertação dos seus monómeros, mas também devido ao seu pH mais baixo. Observou-se que houve uma alteração de cor do meio de cultura celular DMEM quando se pôs em contato com P, que ficou amarelo. A mudança de cor-de-rosa para amarelo significa que o material é muito ácido.

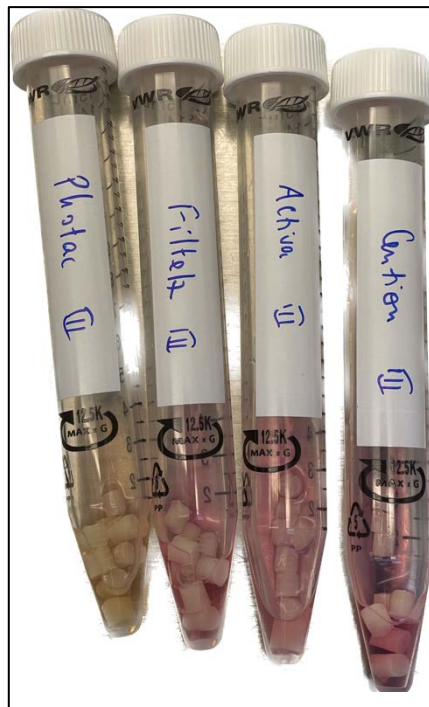


Figura 15. Preparação dos extratos, em que os cilindros de material restaurador ficam submerso em DMEM e incubados durante 24h ou 1 dia. Observam-se diferenças na cor do meio de cultura das células que fica mais amarelo com o aumento de acidez.

Tabela 11. Média das percentagens de viabilidade celular dos fibroblastos em contacto com diferentes quantidades dos extratos dos materiais após 1 semana.

	Média das reduções MTT % viabilidade celular	Média da precisão
A75	61,44	± 6,99
A50	71,75	± 9,78
A25	87,86	± 8,73
A10	85,02	± 10,71
F75	73,63	± 8,29
F50	70,09	± 12,33
F25	60,79	± 16,83
F10	76,13	± 8,14
P75	44,22	± 9,37
P50	49,88	± 8,12
P25	79,88	± 7,29
P10	92,85	± 9,09
C75	60,14	± 8,46
C50	74,16	± 8,78
C25	86,70	± 7,33
C10	79,88	± 7,57

No segundo ensaio com extratos de 1 semana, podemos observar uma tendência para uma ligeira diminuição da citotoxicidade (Figura 16).

Os resultados mostram que:

- O material A é seguro a partir de 50%, sem alterações em relação aos extratos com o mesmo material mas com uma incubação de 24h.
- O material F neste ensaio é biocompatível em todas as concentrações testadas o que sugere alguns erros no ensaio anterior visto que nos ensaios após 24 horas o material nunca se mostrou toxicidade.
- O P é seguro a partir dos 25%, o que o torna mais biocompatível em comparação com os extratos de 24 horas.
- O material C tem valores aceitáveis de viabilidade celular a partir dos 50%.

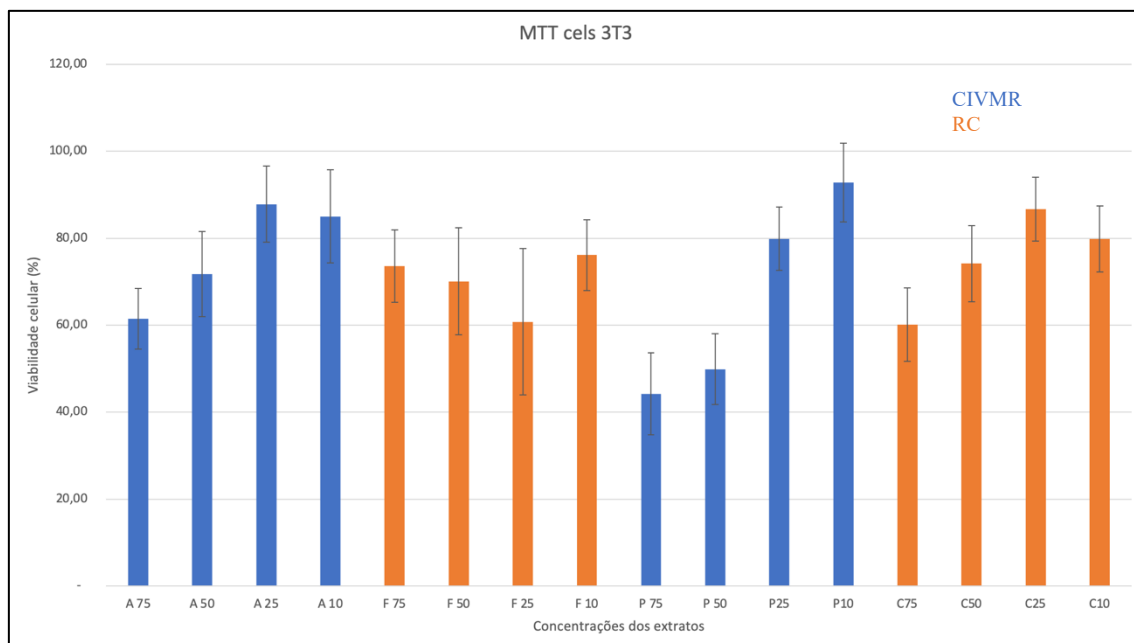


Figura 16. Media das percentagens da viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, dos 2 ensaios de MTT, expostos a diferentes concentrações (75, 50, 25, e 10%) dos extratos de 1 semana incubados com Activa Bioactive Restorative™ (A), Filtek, Z250™ (F), Photac Fil Quick Aplicap™ (P) e Cention Forte®

No gráfico precedente, podemos ver que:

- Nas concentrações mais elevadas, ou seja, 75, 50 e 25% temos uma diferença estatisticamente significativas de viabilidade celular ($p\text{-value} < 0,05$) com vantagem do CIVMR bioativo. Unicamente a partir das diluições de 10% é que encontramos um nivelamento das diferenças de citotoxicidade entre os dois materiais.

- Também podemos observar que, na concentração de 75%, temos uma diferença significativa ($p\text{-value} < 0,05$) de viabilidade celular entre as resinas compostas com benefício do F. Depois as concentrações se encontram iguais exceto na diluição de 25% onde o material bioativo tem resultados melhores do que o material que não apresenta bioatividade.

Podemos afirmar após avaliação estatística que o P é mais citotóxico do que o material A mesmo nos extratos de 1 semana de diluição. O material C é também mais citotóxico que o F na concentração mais alta de 75% e valores de viabilidades iguais sem diferença significativa para as outras concentrações, com uma viabilidade aceitável.

IV. DISCUSSÃO

Com o aparecimento de novos materiais restauradores, é fundamental fazer uma avaliação crítica. Uma das características dos materiais dentários é a necessidade de serem biocompatíveis, ou seja, não prejudicarem os tecidos orais (Francois *et al.*, 2020).

Quando utilizados corretamente, os materiais dentários de restauração direta são geralmente seguros para os pacientes e para os profissionais de saúde, embora exista um pequeno risco de reação indesejável, principalmente devido aos componentes das resinas não polimerizados que entram em contacto com os tecidos humanos (Hatton *et al.*, 2022).

Para garantir a saúde e a segurança dos pacientes, todos os biomateriais utilizados em medicina dentária devem ser testados quanto à biocompatibilidade, utilizando diferentes ensaios. Para seleccionar compostos e definir os efeitos potencialmente prejudiciais de um material nos tecidos orais antes da sua utilização clínica, os ensaios de citotoxicidade são agora necessários em dentisteria operatória. A quantidade de morte celular provocada por substâncias presentes nos seus extratos pode ser medida através de ensaios de citotoxicidade como o ensaio MTT, um ensaio colorimétrico que é sensível, preciso e fiável MTT (Murray *et al.*, 2007).

O MTT composto amarelo, solúvel em água, é convertido em formazan púrpura pelas enzimas desidrogenase mitocondriais que apenas estão funcionais nas células vivas. A quantidade de formazan produzida é diretamente correlacionada com a presença de células viáveis. Para associar a quantidade de formazan produzida com o número de células vivas presentes, o teste MTT analisa a densidade ótica. (Ersahan *et al.*, 2020).

A ausência de uma reação desfavorável importante entre os tecidos orais e os materiais é considerada a definição clássica de biocompatibilidade. Sabe-se atualmente, que muito poucos materiais não interagem significativamente com os tecidos do hospedeiro. A norma ISO 10993-5 fornece diretrizes gerais para os ensaios de citotoxicidade *in vitro* (Murray *et al.*, 2007).

Neste estudo, o tipo de célula utilizado foram os fibroblastos da linha celular embrionária de ratinho NIH/3T3 que mimetizam os fibroblastos muito abundantes da cavidade oral, que desempenham uma variedade de funções vitais no organismo. São consideradas células de referências uma vez que é uma linha celular estável e muito usada neste tipo de investigação (Sahinturk *et al.*, 2018).

Este estudo pretende avaliar a biocompatibilidade de novos materiais restauradores bioativos em comparação com materiais usados na rotina sem caracterização de bioatividade: Activa Bioactive Restorative™, Cention Forte®, Filtek Z250™ e o Photac Fil Quick Aplicap™.

É verdade que se um material fosse comprovadamente tóxico, não sairia no mercado. Não é o objetivo deste estudo contestar a biocompatibilidade do produto ou dizer que ele não deve ser usado nas condições indicadas pelo fabricante. Mas como os fabricantes não revelam sempre todos os componentes dos materiais dentários na MSDS, invocando o segredo da marca, estes estudos são importantes uma vez que os componentes presentes e as suas interações podem afetar o desempenho clínico do produto (Anusavice *et al.*, 2013).

Este estudo avalia a citotoxicidade dos novos materiais no mercado, mas também compara com os níveis de viabilidade celular de materiais do mesmo tipo frequentemente utilizados na clínica. Mesmo que ambos possam ser biocompatíveis ou citotóxicos.

Na literatura relativa aos materiais restauradores bioativos, nomeadamente o Activa™ e o Cention® não existem estudos que testem a biocompatibilidade deles através do ensaio MTT, apenas existem estudos de derivados destes materiais ou com ensaio de viabilidade celular diferente.

Após um período de incubação de 24 horas ou 1 semana com os cilindros de materiais, as células 3T3 foram aos extratos obtidos e a percentagem de viabilidade celular foi calculada. Ao longo deste protocolo, as células foram incubadas por 24 horas com várias diluições dos extratos de materiais restauradores. Essas diluições foram obtidas diluindo os extratos das resinas em meio de cultura das células, DMEM. Após ter confirmado que nas concentrações mais elevadas os extratos produzidos em 24h eram citotóxicos para os

fibroblastos, foi interessante avaliar se as células reagiriam de maneira diferente quando em contacto com extratos produzidos por incubações mais longas, concretamente de 1 semana. Sabemos que um material não é citotóxico quando mantém os níveis de viabilidade celular acima de 70%, de acordo com a norma ISO 10993-5 de 2009.

Nos ensaios dos extratos de 24 horas, observámos uma diminuição da morte celular com o aumento da diluição dos extratos dos materiais, confirmando que o efeito na viabilidade resulta da exposição aos extratos. É verdade que a resina composta Filtek™, utilizada também como controlo do Cention, mostrou ser o material mais biocompatível mesmo com extratos à concentração de 100%, enquanto o ionómero de vidro Photac™, controlo do material bioativo Activa, foi o material com a taxa de viabilidade celular mais baixa, ou seja, o mais citotóxico, em que a viabilidade celular se encontra acima dos 70% só a partir das concentrações a 25%. Os nossos resultados mostram que os materiais bioativos só podem ser considerados não citotóxicos a partir das diluições de extratos de 50% para o Activa™ e de 25% para o Cention®.

Com os extratos de 1 semana, obtivemos resultados similares. Como no ensaio anterior, o Filtek™ é o mais biocompatível mesmo às concentrações mais elevadas de extrato e novamente o Photac™ só tem citotoxicidade aceitável a partir das diluições de 25% dos extratos. A única diferença é uma troca de ordem entre os materiais bioativos em que o Cention® mostrou ser menos citotóxico em que o valor de dose letal de 50%, LD50 corresponde ao extrato com uma concentração de 74,16% e o Activa™ com um LD50 de 71,75%.

Na literatura, segundo Ersahan *et al* (2020) foi demonstrado que os CIVMR são mais citotóxicos do que os CIV tradicionais, induzindo mais morte celular *in vitro* e uma redução considerável do metabolismo celular. O baixo pH durante a presa, bem como a libertação e migração de numerosas substâncias, como os iões de fluoreto, que são libertados pelos cimentos de ionómero de vidro em geral, têm sido implicados na citotoxicidade dos CIVMR. No nosso estudo, podemos confirmar este fator como possivelmente responsável da baixa biocompatibilidade do material. De facto, vimos que a cor do tubo com os extratos concentrados do Photac™ mudaram de cor para amarelo indicando um aumento de acidez do meio DMEM.

Ainda segundo Ersahan *et al* (2020), o HEMA, um agente citotóxico conhecido, é uma das explicações mais frequentemente citadas para a elevada citotoxicidade dos CIVMR. O HEMA não polimerizado pode ser responsável pela toxicidade observada dos CIVMR, de acordo com os resultados de outras investigações. Muitas investigações demonstraram que quantidades detetáveis de HEMA podem ser libertadas em soluções de extrato, as quais, quando adicionadas a uma cultura de células, podem causar uma série de vias intracelulares que resultam em morte celular por apoptose. O HEMA remanescente é hidrofílico e tem um baixo peso molecular, permitindo-lhe passar rapidamente através dos túbulos dentinários e atingir as células da polpa dentária. A quantidade de dentina que permanece entre o tecido pulpar e o pavimento da cavidade determina a quantidade de danos causados às células pulpares pelos monómeros remanescentes. Por conseguinte, pode prever-se que os CIVMR causem uma resposta inflamatória quando administrados diretamente no tecido conjuntivo.

Na investigação de Ersahan *et al* (2020), o PhotacTM não apresentou toxicidade e foram utilizados extratos de materiais diluídos a 10%. Podemos relacionar os resultados deste estudo com o nosso trabalho que também não apresenta citotoxicidade com extrato a 10%, quer sejam extratos de 24 horas ou de 1 semana.

Suciu *et al* (2016), estudou a biocompatibilidade de materiais restauradores estéticos, incluindo o FiltekTM utilizando os ensaios de viabilidade com azul de alamar e por coloração imunocitoquímica, em que nas primeiras duas horas, as células expostas aos materiais mostram resultados comparáveis aos das células cultivadas em superfícies de plástico convencionais sem extratos de materiais, indicando que a toxicidade destes substratos não é elevada.

No entanto, segundo Suciu *et al* (2016), após 2 horas encontrou resultados significativamente diferente. De facto, o número de células diminui substancialmente quando as células cultivadas foram expostas aos substratos durante 3 a 5 dias, o que pode ser atribuído à capacidade limitada destes materiais para promover a adesão das células e também ao tipo de ensaio utilizado. No entanto, é preciso ter em conta que são necessárias várias lavagens ao longo do protocolo imunocitoquímico, que podem provocar a dissociação da superfície e consequente eliminação das células durante o processo de coloração. De uma maneira geral, podemos fazer o paralelo com o nosso estudo e

confirmar a biocompatibilidade do Filtek™ em todas as diluições de extratos testadas nas primeiras 24h (as condições utilizadas neste estudo). As diferenças ocorrem apenas após 3 dias devido às diferenças dos ensaios que requerem manipulações de um lado e não do outro, condições que não são comparáveis com o nosso estudo.

Lopez-Garcia *et al* (2019) realizaram um estudo sobre o Activa KIDS Bioactive Restorative™, um derivado do Activa™ para um uso pediátrico sobre células humanas pulpar. Em ambos os períodos de tempo avaliados, 24, 48 e 72 horas, verificaram um aumento da atividade metabólica com o aumento da diluição, nas culturas tratadas com Activa KIDS™, o que indica uma diminuição da citotoxicidade, ou seja, viabilidade celular crescente em função do aumento da diluição. Estes resultados são similares aos nossos obtidos com células 3T3.

Recentemente, Wuersching *et al* (2023) realizaram testes de biocompatibilidade de Cention Forte® e Activa™. O estudo da viabilidade celular foi realizado sobre fibroblastos humanos HGF1 através de ensaio dos níveis celulares de ATP, concentração de glutathiona oxidada. Verificaram que ambos os materiais afetavam a divisão celular e diminuíam drasticamente os níveis de ATP, o que está de acordo com os nossos resultados nas concentrações mais elevadas dos extratos.

Os dois principais monómeros encontrados nos extratos de Cention® e Activa™ foram o metacrilato hidroxietilo metacrilato (HEMA) e o metacrilato de metilo (MMA) (Wuersching *et al.*, 2023).

Atualmente, os materiais restauradores são os dispositivos médicos mais importantes, tendo em conta o número de pacientes que ajudam e o seu nível de sofisticação tecnológica (Hatton *et al.*, 2022).

É discutível se se deve ou não avaliar a biocompatibilidade de um material utilizando um ensaio de cultura de células *in vitro* e, em seguida, extrapolar para tentar antecipar a forma como o tecido oral irá reagir *in vivo*. De facto, verificou-se que os testes de implantação de biocompatibilidade *in vivo* em animais e as avaliações de biocompatibilidade geradas por ensaios de cultura celular nem sempre estão de acordo, por isso aumentam as regras de normalização da utilização de ensaios de citotoxicidade e o contexto da sua aplicação (Murray *et al.*, 2007).

Devido ao número crescente de pacientes tratados e de dente restaurados com os materiais restauradores, a questão da biocompatibilidade deve ocupar um lugar muito importante durante a realização de atos clínicos.

Hoje em dia sabemos que nenhum material nem dispositivo é biocompatível a 100%, e este fato reforça a importância de realizar ensaios de citotoxicidade para escolher o melhor, ou seja, um material biocompatível a 100%.

Os futuros trabalhos devem ser realizados para caracterizar os efeitos moleculares dos constituintes e substâncias dos materiais restauradores bioativos que desenvolvem reações tóxicas nas células, sobretudo nas concentrações mais elevadas, para compreender o mecanismo celular que induz a morte das células em contacto com os materiais.

V. CONCLUSÃO

Podemos concluir com os resultados obtidos nesta investigação e com as limitações inerente a este trabalho que aceitamos a hipótese experimental alternativa em que os materiais, Activa Bioactive Restorative™, Cention Forte® apresentam níveis de citotoxicidade nas células 3T3 diferentes dos materiais considerados como controlos, ou seja o Filtek Z250™ e o Photac™ entre eles. O nível de citotoxicidade aumenta proporcionalmente com a aumentação das concentrações de extratos.

Neste estudo, vimos que entre os CIVMR testados, o material menos citotóxico é o material bioativo, Activa Bioactive Restorative™, com diferenças significativas de viabilidade celular nas mesmas concentrações.

Verificámos também que entre as resinas compostas testadas, a menos citotóxica é o material não bioativo, ou seja, o Filtek Z250™, com diferenças de viabilidade celular elevadas, exceto nas menores concentrações. Neste estudo, esta resina composta não induz variações dos níveis de citotoxicidade. A viabilidade celular é sempre muito alta em todas as concentrações testadas, incluindo as mais elevadas. É considerada não citotóxica em todas as condições testadas.

Os extratos de 24h dos materiais restauradores apresentam diferenças de citotoxicidade, apresentando um grau de toxicidade crescente Filtek™ > Activa™ > Cention® > Photac™. Utilizando os extratos de 1 semana obtemos uma pequena inversão, sendo por ordem crescente de toxicidade Filtek™ > Cention® > Activa™ > Photac™. No entanto, podemos concluir o grau de citotoxicidade de ambos os materiais bioativos testados é muito semelhante.

O tempo de incubação dos extratos aumentou ligeiramente a percentagem de viabilidade celular e sobretudo o aumento das concentrações de extratos diminui as percentagens de viabilidade celular, exceto para o Filtek™.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Anusavice, K. J. , Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). *Phillips' Science of Dental Materials*.
- Bapat, R. A., Parolia, A., Chaubal, T., Dharamadhikari, S., Abdulla, A. M., Sakkir, N., Arora, S., Bapat, P., Sindi, A. M., & Kesharwani, P. (2021). Recent update on potential cytotoxicity, biocompatibility and preventive measures of biomaterials used in dentistry. In *Biomaterials Science* (Vol. 9, Issue 9, pp. 3244–3283). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d1bm00233c>
- Benetti, F. (2019). Bioactive Materials in Dentistry: Remineralization and Biomineralization. *Dentistry and Oral Sciences*.
- Borzangy, S., Labban, N., & Windsor, L. J. (2013). Effects of interim acrylic resins on the expression of cytokines from epithelial cells and on collagen degradation. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(4), 296–302. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60379-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60379-0)
- Buranaamnuay, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. In *Open Veterinary Journal* (Vol. 11, Issue 2, pp. 251–269). Faculty of Veterinary Medicine, University of Tripoli. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9>
- Cengiz, S., Velioglu, N., Cengiz, M. İ., Özlü, F. Ç., Akbal, A. U., Çoban, A. Y., & Özcan, M. (2022). Cytotoxicity of Acrylic Resins, Particulate Filler Composite Resin and Thermoplastic Material in Artificial Saliva with and without Melatonin. *Materials*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/ma15041457>
- Chaput, F., & Faure, A.-C. (2019). *Composites dentaires Composites dentaires Dental composites*. <https://doi.org/10.51257/a-v2-med7500i>
- Chen, L., Shen, H., & Suh, B. I. (2013). Bioactive dental restorative materials: a review. *American Journal of Dentistry*, 26(4), 219–227.
- Chen, S., Mestres, G., Lan, W., Xia, W., & Engqvist, H. (2016). Cytotoxicity of modified glass ionomer cement on odontoblast cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(7). <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5729-y>

- Crawford, L., Wyatt, M., Bryers, J., & Ratner, B. (2021). Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 10, Issue 11). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002153>
- de Moraes, M. D. R., de Melo, M. A. S., Bezerra, D. da S., Costa, L. S., Saboia, V. de P. A., & Rodrigues, L. K. A. (2015). Clinical study of the caries-preventive effect of resin-modified glass ionomer restorations: aging versus the influence of fluoride dentifrice. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 7(2), 180–186. <https://doi.org/10.1111/jicd.12140>
- Ersahan, S., Oktay, E. A., Sabuncuoglu, F. A., Karaoglanoglu, S., Aydın, N., & Suloglu, A. K. (2020). Evaluation of the cytotoxicity of contemporary glass-ionomer cements on mouse fibroblasts and human dental pulp cells. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 21(3), 321–328. <https://doi.org/10.1007/s40368-019-00481-1>
- Farrugia, C., & Camilleri, J. (2015). Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements - A literature review. *Dental Materials*, 31(4), e89–e99. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.12.005>
- Ferracane, J. L. (2011). Resin composite—State of the art. *Dental Materials*, 27(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2010.10.020>
- Franca, C. M., Balbinot, G. de S., Cunha, D., Saboia, V. de P. A., Ferracane, J., & Bertassoni, L. E. (2022). In-vitro models of biocompatibility testing for restorative dental materials: From 2D cultures to organs on-a-chip. *Acta Biomaterialia*, 150, 58–66. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2022.07.060>
- Francois, P., Fouquet, V., Attal, J. P., & Dursun, E. (2020). Commercially available fluoride-releasing restorative materials: A review and a proposal for classification. In *Materials* (Vol. 13, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma13102313>
- Freire, W. P., Fook, M. V. L., Barbosa, E. F., dos S. Araújo, C., Barbosa, R. C., & Pinheiro, Í. M. F. (2015). Biocompatibility of dental restorative materials. *Materials Science Forum*, 805, 19–25. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.805.19>
- Garchitorena, M. I. (2019). Vidrios bioativos en odontología restauradora. *Odontoestomatología*, 21(34). <https://doi.org/10.22592/ode2019n34a5>

- Hamama, H. H., Burrow, M. F., & Yiu, C. (2014). Effect of dentine conditioning on adhesion of resin-modified glass ionomer adhesives. *Australian Dental Journal*, 59(2), 193–200. <https://doi.org/10.1111/adj.12169>
- Hatton, P. V., Mulligan, S., & Martin, N. (2022). The safety and biocompatibility of direct aesthetic restorative materials. *British Dental Journal*, 232(9), 611–614. <https://doi.org/10.1038/s41415-022-4198-6>
- Innes, N. P. T., Ricketts, D., Chong, L. Y., Keightley, A. J., Lamont, T., & Santamaria, R. M. (2015). Preformed crowns for decayed primary molar teeth. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2015, Issue 12). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005512.pub3>
- ISO 10993-5:2009. (2009). Biological evaluation of medical devices.
- ISO 10993-12:2012. (2012). Biological evaluation of medical devices.
- Khoroushi, M., & Keshani, F. (2013). A review of glass-ionomers: From conventional glass-ionomer to bioactive glass-ionomer. In *Dental Research Journal 411 Dental Research Journal* (Vol. 10).
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kusgoz, A., Ülker, M., Yesilyurt, C., Yoldas, O. H., Ozil, M., & Tanriver, M. (2011). Silorane-based composite: Depth of cure, surface hardness, degree of conversion, and cervical microleakage in class II cavities. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 23(5), 324–335. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2011.00411.x>
- Kus-liśkiewicz, M., Fickers, P., & Ben Tahar, I. (2021). Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: Recent advances in methodologies and regulations. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222010952>
- Ladino, L. G., Bernal, A., Calderón, D., & Cortés, D. (2021). *Bioactive Materials in Restorative Dentistry: A Literature Review SVOA Dentistry*.
- Lardani, L., Derchi, G., Marchio, V., & Carli, E. (2022). One-Year Clinical Performance of Activa™ Bioactive-Restorative Composite in Primary Molars. *Children*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/children9030433>

- Lohbauer, U. (2010). Dental glass ionomer cements as permanent filling materials? -Properties, limitations and future trends. *Materials*, 3(1), 76–96. <https://doi.org/10.3390/ma3010076>
- Mallineneni, S. K., Nuvvula, S., Matinlinna, J. P., Yiu, C. K., & King, N. M. (2013). Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. In *Journal of investigative and clinical dentistry* (Vol. 4, Issue 1, pp. 9–19). <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2012.00140.x>
- Melo, M. A. S., Mokeem, L., & Sun, J. (2022). Bioactive Restorative Dental Materials—The New Frontier. *Dental Clinics of North America*, 66(4), 551–566. <https://doi.org/10.1016/J.CDEN.2022.05.005>
- Moharamzadeh, K., Brooki, I. M., & Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of resin-based dental materials. In *Materials* (Vol. 2, Issue 2, pp. 514–548). <https://doi.org/10.3390/ma2020514>
- Murray, P. E., Godoy, C. G., & Godoy, F. G. (2007). *How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated?*
- Peutzfeldt, A. (1997). EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES. In *Ear J Oral Sci* (Vol. 105).
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1601, pp. 1–17). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Rasines Alcaraz, M. G., Veitz-Keenan, A., Sahrman, P., Schmidlin, P. R., Davis, D., & Iheozor-Ejiofor, Z. (2014). Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2014, Issue 3). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005620.pub2>
- Remadi, A. (2020). *Les nouveaux matériaux de restauration relarguant du fluor : caractérisation de leurs propriétés mécaniques et de leur potentialité clinique*. Science du vivant.
- Sahinturk, V., Kacar, S., Vejselova, D., & Kutlu, H. M. (2018). Acrylamide exerts its cytotoxicity in NIH/3T3 fibroblast cells by apoptosis. *Toxicology and Industrial Health*, 34(7), 481–489. <https://doi.org/10.1177/0748233718769806>

- Schmalz, G., & Widbiller, M. (2022). Biocompatibility of Amalgam vs Composite - A Review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 20(1), 149–156. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.b2831749>
- Shahi, S., Özcan, M., Maleki Dizaj, S., Sharifi, S., Al-Haj Husain, N., Eftekhari, A., & Ahmadian, E. (2019). A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. In *Toxicology Mechanisms and Methods* (Vol. 29, Issue 5, pp. 368–377). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566424>
- Siqueira, P. C., Magalhães, A. P. R., Pires, W. C., Pereira, F. C., Silveira-Lacerda, E. P., Carrião, M. S., Bakuzis, A. F., Souza-Costa, C. A., Lopes, L. G., & Estrela, C. (2015). Cytotoxicity of glass ionomer cements containing silver nanoparticles. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 7(5), e622–e627. <https://doi.org/10.4317/jced.52566>
- St. John, K. R. (2007). Biocompatibility of Dental Materials. In *Dental Clinics of North America* (Vol. 51, Issue 3, pp. 747–760). <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.03.003>
- Stoddart, M. J. (2011). Cell Viability Assays: Introduction. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 740, pp. 1–6). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Tiu, J., Belli, R., & Lohbauer, U. (2021). Characterization of heat-polymerized monomer formulations for dental infiltrated ceramic networks. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/app11167370>
- Tjäderhane, L., & Tezvergil-Mutluay, A. (2019). Performance of Adhesives and Restorative Materials After Selective Removal of Carious Lesions: Restorative Materials with Anticaries Properties. In *Dental Clinics of North America* (Vol. 63, Issue 4, pp. 715–729). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2019.05.001>
- Todaro, G. J., & Green, H. (1963). *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.*
- Vallittu, P. K., Boccaccini, A. R., Hupa, L., & Watts, D. C. (2018). Bioactive dental materials—Do they exist and what does bioactivity mean? In *Dental Materials* (Vol. 34, Issue 5, pp. 693–694). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.001>

- Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., Scheers, H., Godderis, L., Hoet, P., & Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. In *Dental Materials* (Vol. 27, Issue 8, pp. 723–747). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>
- Wuersching, S. N., Högg, C., Kohl, L., Reichl, F. X., Hickel, R., & Kollmuss, M. (2023). Leaching components and initial biocompatibility of novel bioactive restorative materials. *Dental Materials*, 39(3), 293–304. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2023.01.008>
- Zafar, M. S., Amin, F., Fareed, M. A., Ghabbani, H., Riaz, S., Khurshid, Z., & Kumar, N. (2020). Biomimetic aspects of restorative dentistry biomaterials. In *Biomimetics* (Vol. 5, Issue 3, pp. 1–42). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomimetics5030034>
- Zhang, K., Zhang, N., Weir, M. D., Reynolds, M. A., Bai, Y., & Xu, H. H. K. (2017). Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. In *Dental Clinics of North America* (Vol. 61, Issue 4, pp. 669–687). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.05.002>