



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE DOS DIFERENTES
CONSTITUINTES DAS RESINAS COMPOSTAS PROTEMP 4TM,
STRUCTUR 3R E TAB2000**

Trabalho submetido por
Inês Pacheco
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES CONSTITUINTES DAS
RESINAS COMPOSTAS, PROTEMP 4TM, STRUCTUR 3R E
TAB2000**

Trabalho submetido por
Inês Pacheco
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

outubro de 2015

Agradecimentos

O presente estudo não teria sido possível sem a orientação da Prof. Doutora Isabel Barahona, a quem agradeço em primeiro lugar a disponibilidade e todo o auxílio que me prestou ao longo deste projeto. Quero igualmente agradecer ao professor Paulo Mascarenhas a paciência e empenho que teve para me ajudar a concretizar esta dissertação.

Também não poderia esquecer, neste mesmo âmbito, o auxílio prestado pela professora Susana Bandarra, à qual devo um sincero agradecimento pelos seus contributos.

Quero ainda distinguir as minhas colegas de curso, Joana Cabral, Mariana Monteiro e Ana Pires, por me apoiarem com uma palavra amiga e sincera, nos momentos mais difíceis ao longo deste percurso.

Agradeço também à minha família, aos meus pais e irmã, pela confiança que depositaram em mim, pelos sacrifícios que fizeram ao longo deste exigente curso e por me incentivarem sempre a alcançar novas metas e novos desafios.

Não posso deixar de me referir a Nuno Mourão, cujo apoio foi fundamental para a consecução deste trabalho, a nível informático.

Agradeço ao Alexandre Lopes por ter estado sempre presente, mesmo nas horas mais difíceis, prescindindo até do seu tempo, só para me ajudar.

Resumo

Os monómeros metilmetacrilato, bisfenol-A- glicidil metacrilato e dimetacrilato de uretano são constituintes de resinas compostas, utilizadas na prática de Medicina Dentária, como material de restauração provisória, nomeadamente na cimentação de coroas provisórias.

O objetivo principal deste estudo foi compreender qual o nível de citotoxicidade causado pelos monómeros, quando em contacto com linhas celulares 3T3 de ratinho.

Para esse efeito procedeu-se à diluição de dois dos monómeros (MMA e Bis-GMA) numa solução com água, sendo que o outro monómero (UDMA) foi diluído numa solução que continha etanol e acetonitrilo.

Estas soluções foram colocadas em contacto com as culturas de células e ao final de 24 horas foi analisada a viabilidade celular, com recurso ao teste de MTT.

Os resultados demonstram que o monómero mais tóxico é o UDMA, sobretudo quando a concentração do mesmo se encontra mais elevada, dados que comprovam o efeito dose-dependente.

Relativamente aos outros dois monómeros, o segundo mais citotóxico é o Bis-GMA, que provoca menores taxas de viabilidade celular, quando se encontra em maior concentração.

O monómero MMA é o menos citotóxico dos três monómeros, independentemente da concentração utilizada.

É importante referir, quanto aos resultados obtidos no controlo utilizando as soluções de etanol e acetonitrilo, que estes dois compostos provocam uma determinada taxa de morte

celular, podendo também esse aspeto influenciar os resultados obtidos em relação à taxa de morte celular provocada pelos monómeros.

Podemos, no entanto, concluir que todos os monómeros utilizados nesta investigação induzem a morte celular, sobretudo o monómero UDMA, resultado que evidencia o efeito citotóxico *in vitro* dos monómeros quando em contacto com as células 3T3.

Palavras-Chave: células, monómero, citotoxicidade, biocompatibilidade

Abstract

The monomers methyl methacrylate, Bisphenol-A-glycidyl methacrylate and urethane dimethacrylate are constituents of various composites, used in the practice of dentistry, such as temporary restoration material, particularly in provisional crowns.

The aim of this study was to understand the level of cytotoxicity of these monomers, when in contact with 3T3 mouse cell lines.

For this purpose this investigation proceeded to the dilution of the two monomers (MMA e Bis-GMA) in a solution of water, wherein the other monomer (UDMA) was diluted in a solution containing, acetonitrile and ethanol.

These solutions were placed in contact with the 3T3 cell cultures and after 24 hours, cell viability was analyzed using the MTT assay.

The results demonstrate that the most toxic monomer is UDMA, especially when the urethane concentration is higher, and thus proving the dose-dependent effect.

For the other two monomers, the latter, Bis-GMA, is cytotoxic, in situations where the monomer concentration is higher.

The MMA monomer is the least cytotoxic of the three monomers, regardless of concentration.

It is important to note in the results obtained in the control using ethanol and acetonitrile, that these two compounds cause a certain rate of cell death. So this aspect may also influence the results obtained in relation to the rate of cell death caused by monomers.

We may, however, conclude that all monomers used in this study induce to cell death, especially UDMA, a result which shows the cytotoxic effect *in vitro* of monomers when in contact with 3T3 cells.

Key Words: cells, monomers, cytotoxicity, biocompatibility

Índice Geral

| | |
|-------------------------------------|----|
| Agradecimentos..... | 3 |
| Resumo..... | 5 |
| Abstract | 7 |
| Índice Geral..... | 9 |
| Índice de Figuras | 10 |
| Índice de Gráficos | 13 |
| Índice de Tabelas..... | 13 |
| Lista de abreviaturas | 15 |
| Introdução Teórica | 17 |
| Resinas Compostas..... | 17 |
| Ensaio do MTT | 24 |
| Hipóteses Experimentais..... | 32 |
| Materiais e Métodos | 33 |
| Soluções Stock | 36 |
| Cultura de células | 37 |
| Experiências | 39 |
| Análise de dados estatísticos | 44 |
| Resultados | 45 |
| Discussão..... | 57 |
| Conclusão..... | 64 |
| Bibliografia | 65 |

Índice de Figuras

| | |
|-----------------|----|
| figura 1 | 18 |
| figura 2 | 25 |
| figura 3 | 27 |
| figura 4 | 29 |
| figura 5 | 28 |
| figura 6 | 37 |
| figura 7 | 39 |
| figura 8 | 40 |
| figura 9 | 40 |
| figura 10 | 43 |

Índice de Gráficos

| | |
|-----------------|----|
| Gráfico 1 | 45 |
| Gráfico 2 | 48 |
| Gráfico 3 | 50 |
| Gráfico 4 | 53 |

Índice de Tabelas

Casos

| | |
|-----------------|----|
| Tabela 1 | 43 |
| Tabela 2 | 44 |
| Tabela 3 | 44 |
| Tabela 4 | 46 |
| Tabela 5 | 46 |
| Tabela 6 | 48 |
| Tabela 7 | 48 |
| Tabela 8 | 49 |
| Tabela 9 | 50 |
| Tabela 10 | 51 |
| Tabela 11 | 52 |
| Tabela 12 | 53 |
| Tabela 13 | 54 |

Lista de abreviaturas

ISO: Internation Organization for Standardization

MO: Microscópio Óptico

Bis-GMA: bisfenol-A glicidil metacrilato

UDMA : Dimetacrilato de Uretano

MMA : Metilmetacrilato

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

FBS: fetal bovine serum

PBS: Phosphate Buffered Saline

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

DMSO: dimetilsulfóxido

3T3: Células 3T3

M1: MMA

M2: Bis-GMA

M3: UDMA

Introdução Teórica

Resinas Compostas

As resinas compostas são os materiais dentários mais utilizados em medicina dentária, no âmbito da medicina restauradora, ou seja, são maioritariamente utilizadas em restaurações diretas de dentes (Mitchell, Koike & Okabe, 2007).

O aparecimento das primeiras resinas compostas, desenvolvidas à base de metacrilato, deu-se na década de 40 do século XX. Contudo, mais tarde foram desenvolvidas na forma de polímeros de cianoacrilato.

A nível laboratorial, estas resinas apresentavam um comportamento adequado, contudo, quando utilizadas na clínica apresentavam baixa resistência ao desgaste, ocorria a evaporação de monómeros e ocorria também, aquando da polimerização, uma alta taxa de contração da resina, permitindo assim a infiltração nas margens da restauração, o que propicia o surgimento de lesão de cárie (Naoum et al., 2012; Solderholm & Mariotti, 1999; Rawls & Esquivel-Upshaw, 2005).

Neste sentido, registaram-se melhorias nas propriedades mecânicas e químicas dos materiais, nomeadamente para reduzir a contração associada à polimerização (Naoum et al., 2012).

Neste contexto, Bowen em 1965, desenvolveu uma reação entre o bisfenol-A e o glicidil metacrilato, criando assim os dimetacrilatos, e que atualmente são a base das resinas compostas comercializadas (Bowen & Marjenhoff 1992).

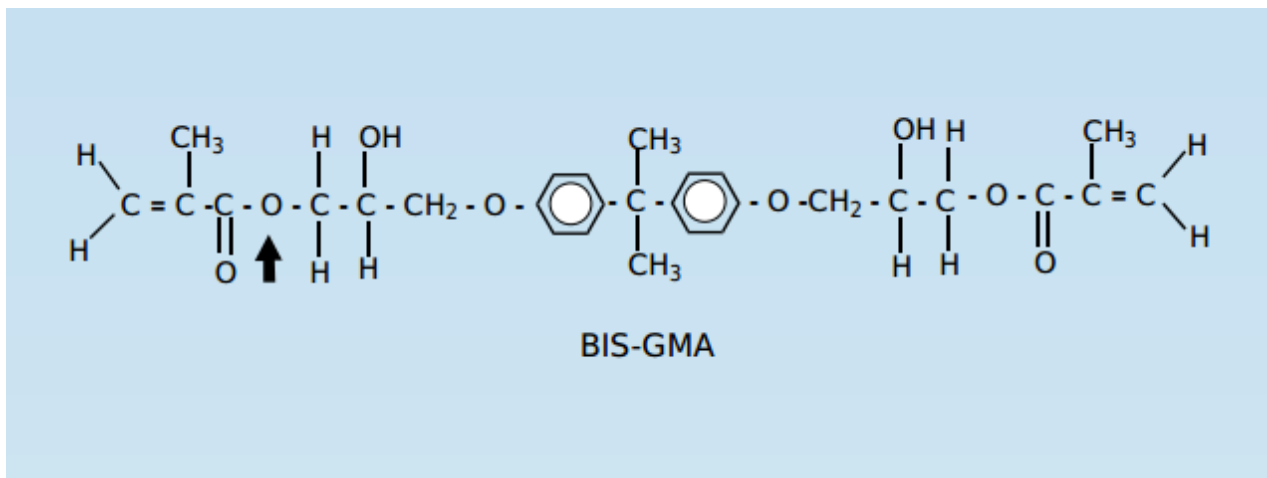


Figura 1. Representação do monómero Bisfenol-A glicidil metacrilato (Solderhom, 1999).

Com o intuito de resolver um dos principais problemas das propriedades mecânicas e químicas nas resinas compostas, introduziram-se modificações na composição das mesmas, tendo sido acrescentado um monómero de baixa concentração e alto peso molecular, para evitar o efeito de contração na polimerização (Naoum et al., 2012; Eick et al., 2005; Peutzfeldt, 1997).

A composição das resinas compostas inclui uma matriz orgânica e uma matriz inorgânica. Relativamente à matriz orgânica, temos como seus principais componentes o sistema ativador (este sistema é o responsável pelo começo da polimerização), os pigmentos (dão coloração à resina de forma a mimetizar a coloração do dente) e os inibidores da polimerização, que permitem aumentar o tempo de trabalho. Existem ainda as partículas de preenchimento, bem como agente de união (faz a ligação entre as partículas de preenchimento e a matriz orgânica da resina) (Peutzfeldt, 1997; Anusavice, 2003).

A matriz orgânica tem, também, Bisfenol-A glicidilmetacrilato (Bis-GMA) na sua constituição. Foram ainda desenvolvidos monómeros como o dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), o dimetacrilato de uretano (UDMA), o 2-hidroxil metacrilato (HEMA) e o Bisfenol-A dimetacrilato etoxilado (Bis-EMA) (Anusavice, 2003).

A composição da matriz inorgânica é formada por partículas de substâncias como o quartzo, sílica, fibras de vidro, silicato de alumínio, vidro de bário e outros constituintes (Rodrigues, Scherrer, Ferracane & Della, 2008; Peutzfeldt, 1997).

A biocompatibilidade dos materiais dentários restauradores, nomeadamente das resinas é determinada, sobretudo, pelos seus constituintes orgânicos, quer pela sua quantidade, quer pela sua natureza (Geurtsen, W. 2000).

Quanto aos efeitos citotóxicos causados pelos monómeros isoladamente, sabe-se, segundo Schweikl, Spagnuolo & Schmalz, (2006) que esses efeitos ocorrem nas células, associados a danos na membrana celular, atraso e interrupção do ciclo celular e inibição de atividades enzimáticas do metabolismo celular.

Segundo Kostoryz et al. (2001), o aumento da concentração de substâncias tóxicas, nomeadamente dos monómeros Bis-GMA e MMA, pode levar à diminuição de leucócitos para o local onde está a ocorrer a inflamação. Estas substâncias podem alterar a normal função da célula, contribuindo assim para reacções biológicas adversas (Gregson, O'neill, Platt & Windsor, 2008).

Outra questão colocada relativamente aos componentes dos compósitos, é que estes podem alterar a secreção de citocinas dos monócitos humanos, em concentrações subletais (Schweikl, Spagnuolo & Schmalz, 2006).

Segundo a investigação de Rakich, Wataha, Lefebvre & Weller (1999), concluiu-se com base nas experiências efetuadas e nos dados recolhidos, que certos materiais citotóxicos são, de facto, prejudiciais à resposta inflamatória, já que são capazes de alterar a capacidade de defesa imunológica mediada pelos macrófagos, sobretudo em altas concentrações do tóxico. Neste caso, os monómeros Bis-GMA e UDMA são capazes de suprimir enzimas mitocondriais, como a succinato desidrogenase, o que leva a alteração da função dos macrófagos.

O monómero Bis-GMA liberta-se da resina fotopolimerizada, apenas 24h depois de ter ocorrido a contração de polimerização. A partir daí, ele pode ser rapidamente

incorporado no estômago ou intestinos e ser assim distribuído pelo organismo (Reichl et al., 2008; Kuan, Huang, Li & Chang, 2012).

Foi também estudado por Urcan et al. (2010), que os monómeros Bis-GMA e UDMA têm efeitos nocivos sobre os fibroblastos da gengiva humana, designadamente, efeitos citotóxicos e genotóxicos, ou seja, para além de matarem as células (citotoxicidade) afetam directamente a estrutura da cadeia dupla de DNA (genotoxicidade). Também foi afirmado por outros autores que os monómeros das resinas são muito tóxicos para os fibroblastos gengivais, nomeadamente quando postos em contacto com o Bis-GMA e o UDMA (Moharamzadeh, Noort, Brook & Scutt, 2007).

Logo, é fundamental que, nos dias de hoje, os profissionais de medicina dentária tenham em consideração vários parâmetros dos biomateriais, tais como a sua resistência estética e funcionalidade, bem como a sua biocompatibilidade (Patroi et al., 2013).

A aplicação clínica dos resultados obtidos através da investigação da cultura de células 3T3 é difícil de interpretar e extrapolar, uma vez que a mucosa oral é mais resistente ao contacto com os agentes tóxicos do que a linha celular 3T3. Deve-se este facto à existência de camadas de mucinas e queratina (Dahl et al., 2006).

Testes de Biocompatibilidade

A biocompatibilidade consiste na capacidade de os tecidos vivos ou órgãos desenvolverem uma resposta biológica adequada quando em contacto com algum material exógeno, resultando assim numa interface dinâmica tecido/material, dependente de alguns fatores, entre eles: as propriedades do material a ser utilizado, o local onde irá ser utilizado e também a resposta do hospedeiro perante o material. Nesta ótica, é imperativo realizar os testes de biocompatibilidade dos materiais por forma a verificar a aceitação destes materiais por parte do hospedeiro. Assim, realizar testes de citotoxicidade é um dos primeiros passos para testar a aplicabilidade dos materiais a tecidos biológicos humanos (Anusavice, 2012).

Segundo Patroi et al (2013), a definição de biocompatibilidade é a capacidade de um material estranho ser aceite, quando em contacto com um sistema vivo, dentro dos limites desse organismo vivo, bem como a nível dos seus parâmetros psicológicos.

Esta tem sido uma das grandes problemáticas em Medicina Dentária, nomeadamente na prática clínica, e prende-se com o facto de alguns materiais dentários utilizados no quotidiano possuírem algum nível de citotoxicidade (Patroi et al., 2013).

No caso das resinas compostas, estas são colocadas na cavidade oral e lá permanecem durante longos períodos de tempo, sendo por isso imperativo examinar os efeitos citotóxicos que estas resinas possam induzir a longo prazo, ou seja, para isso é necessário estudar a citotoxicidade dos materiais polimerizados num ambiente que mimetiza as condições que estes materiais encontram na cavidade oral (Nakamura & Kawahara, 1984).

Assim, o ponto de partida para melhor definir a biocompatibilidade de um material é através da realização de investigação com base em culturas celulares. Tal facto é muito importante, uma vez que este tipo de investigação permite a análise da citotoxicidade de um material num sistema simples, minimizando assim a possibilidade de interpretações erradas dos resultados devido ao número elevado de variáveis (Dahl et al., 2006).

Este tipo de testes pode ser realizado de duas formas, através de testes *in vitro* e de testes *in vivo*. Estes testes melhoraram a compreensão das respostas biológicas a certos materiais, contudo não definem a biocompatibilidade de um material como sendo de 100% (Patroi, et al., 2013).

A *International Organization Standardization* aconselha também a realização de vários testes *in vitro*, já que não é possível definir a biocompatibilidade de um material apenas com um teste.

Para se proceder à avaliação da biocompatibilidade de um material, é necessário efetuar estudos com recurso a culturas de células, já que estas permitem um estudo mais simplificado e com menos variáveis (Lefebvre & Schuster. 1994).

Uma das razões pela qual se recorre a testes *in vitro* para realizar os testes de citotoxicidade prende-se com o facto de estes serem rápidos, económicos e não requererem animais para a sua realização (Ishiyama et al., 1996).

Tal teste é necessário porque nenhum material é inerte ou estático do ponto de vista biológico, pelo contrário, pode ter constituintes tóxicos que, em contacto com os tecidos ou órgãos durante um período de tempo, provoquem reações citotóxicas (Vital, Silva, Sousa & Ferreira, 2008).

Neste contexto foram criados testes que simulem o meio biológico que vai estar em contacto com o material, para que o mesmo possa ser testado e possa ser avaliada a sua toxicidade. Por isso, primeiramente, são realizados testes *in vitro* e só depois são executados os testes *in vivo*. Numa etapa mais avançada da investigação, são então realizados os testes em organismos animais, seguidos dos testes em humanos (Anusavice, 2012).

Este tipo de abordagem experimental permite estudar a resposta de um tipo celular específico a determinados produtos, no entanto as células em cultura não sofrem as mesmas influências fisiológicas a que estão sujeitas as células no organismo, pelo que este tipo de

abordagem experimental permite apenas uma avaliação preliminar da citotoxicidade dos materiais.

Apesar de estes testes efectuados em culturas celulares não poderem garantir a 100% a biocompatibilidade de um material, é-lhes reconhecido, no entanto, o valor acrescido que representam, em ordem a uma melhor compreensão das respostas dadas pelos tecidos biológicos a certos agentes citotóxicos (Patroi et al., 2013).

Neste âmbito, o estudo das respostas dadas pelos tecidos biológicos está devidamente documentada na literatura de especialidade, como a existência de casos de reações alérgicas a determinados materiais dentários, bem como a irritação local provocada por alguns agentes químicos constituintes dos materiais dentários (Chaves, Machado, Vergani, Souza & Giampaolo, 2012).

O método mais utilizado para fazer os testes de citotoxicidade das resinas envolve a incubação de células com o material eventualmente tóxico, durante períodos de tempo variáveis e a concentrações também variáveis, o que permite comparar assim o efeito citotóxico das resinas sobre as células com o grupo de controlo em que as células não são incubadas com as resinas (Chaves et al., 2012).

Uma das vantagens de usar células de linhagem contínua, como é o caso das células 3T3, frequentemente utilizadas em testes de citotoxicidade de materiais dentários, é a sua elevada taxa de crescimento celular.

Contudo, é importante ter em conta que células de linhagem primária representam e mimetizam melhor as condições clínicas, permitindo extrapolar melhor os resultados para aplicação prática em meio clínico. No entanto, essas células apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, quando se faz a recolha de células para cultivar, estas existem em pequeno número, e têm de ser isoladas, requerem bastante tempo para se adaptarem às condições de cultura e apresentam uma capacidade de replicação limitada (Chaves, C. 2009).

Para haver efeito citotóxico, é necessário existir contacto direto entre as células e o agente potencialmente citotóxico, por isso muitos autores defendem que são os monómeros, que permanecem livres após polimerização, os responsáveis pelo efeito citotóxico das resinas compostas (Selimović-Dragaš, Huseinbegović & Hatibović-Kofman, 2012).

Esta libertação de monómeros livres ocorre maioritariamente durante o processo de conversão de monómeros para polímeros, devido a irregularidades durante a fotopolimerização, ou, ainda, devido a factores térmicos, químicos e mecânicos (Selimović-Dragaš et al., 2012).

No entanto, foram feitas investigações que determinaram que os efeitos tóxicos em células orais epiteliais se deviam, não à forma de polimerização requerida, mas sim à formulação específica dos materiais, apesar de as resinas dual serem, de uma maneira geral, menos citotóxicas do que as resinas polimerizadas apenas com luz (Lefebvre, Schuster & Caughman, 1990; Lefebvre, C. & Schuster, G. 1994). Contudo, segundo Dahl et al (2006), não foi encontrado qualquer tipo de relação entre o tipo de polimerização e os níveis de citotoxicidade nas células.

Os níveis de citotoxicidade provocados por agentes químicos testados pelos métodos *in vitro* atingem diversas estruturas e mecanismos, tais como, inibição da síntese de proteínas, ligação irreversível a recetores da membrana, inibição de reações enzimáticas, e destruição da membrana celular (Ishiyama et al., 1996), uma vez que os monómeros têm a capacidade de alterar a camada de lípidos da membrana celular, provocando assim a sua solubilização e alterando a permeabilidade da membrana (Selimović-Dragaš et al., 2012; Moharamzadeh, Noort, Brook & Scutt, 2007).

Aquando da reação de polimerização, existe um certo grau de moléculas de monómero que não se converte numa cadeia de polímeros, pelo que persiste uma percentagem de monómeros residuais (Sofou, Tsoupi, Emmanouil & Karayannis, 2005).

Geralmente, esta taxa de monómeros residuais é maior em resinas ativadas quimicamente do que em resinas ativadas pelo calor (Vallittu, Ruyter & Sebnem, 1998).

Ou seja, grau de conversão de monómeros em polímeros nem sempre é completo, o que leva à existência de monómeros residuais que podem causar irritação na mucosa. Esta é uma vertente bastante problemática destes materiais, uma vez que, na prática clínica,

existem doentes com infeções na mucosa e que, tendo em conta a extensa área de mucosa oral que se encontra exposta a estes materiais, entender a biocompatibilidade destes materiais é de suma importância (Dahl, Frangou-Polyzois, & Polyzois. 2006).

Apesar do esforço para reduzir o número de monómeros livres existentes durante e após a reação de polimerização, o nível destes é cerca de 5% aquando da conversão monómero-polímero, o que é suficiente para causar uma reação citotóxica, conforme é demonstrado nos testes *in vitro* realizados (Selimović-Dragaš et al., 2012).

De acordo com Kedjarun, Charoenworulak & Koontongkaew (1999), quantos mais monómeros forem adicionados para a reação de polimerização, maior é a taxa de monómeros residuais e, logo, maior a citotoxicidade, o que carreta a diminuição da taxa de viabilidade celular.

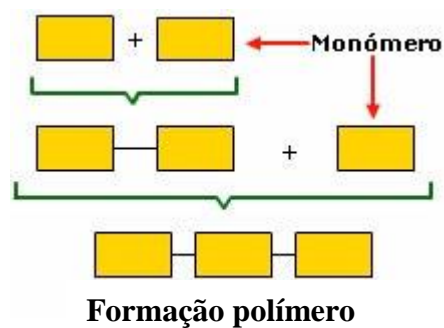


Figura 2. Representação da conversão monómero-polímero (<http://www.educarchile.cl/>).

Estes monómeros residuais que irritam a mucosa são difundidos por um processo em que a água vai penetrar na matriz e expande a cadeia de polímeros, fazendo com que os monómeros que não polimerizaram sejam difundidos para a cavidade oral, nomeadamente para a saliva, sendo distribuídos através da mesma, por toda a cavidade oral (Chaves et al., 2012).

Este quadro resulta na formação de diferentes produtos, que são potencialmente irritantes, sobretudo quando entram em contato com a mucosa dos doentes. Assim, na

avaliação da citotoxicidade das resinas, é aconselhável identificar e quantificar o grau de libertação dos seus componentes citotóxicos.

Ensaio do MTT

Este ensaio foi introduzido pela primeira vez por Mosmann (1983).

O seu nome (MTT) significa metil-tiazolil-tetrazólio (Stockhert, Castro, Canete, Horobin & Villanueva, 2012).

A fórmula química do MTT é (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenol-2H- bromido tetrazólio (Mosmann, 1983).

O ensaio do MTT é um teste colorimétrico, que permite mensurar a quantidade de células viáveis, depois da incubação destas com os tóxicos (Borenfreund & Martin-Alguacil, 1988).

Como refere no seu estudo Borenfreund & Martin-Alguacil, (1988), os testes *in vitro*, como o teste do MTT, podem ser utilizados para selecionar os agentes mais tóxicos de um material.

Este teste tem como objetivo avaliar a função mitocondrial após contacto entre as células e as substâncias potencialmente tóxicas (Wennberg, 1988; ISSO 109993-5).

A atividade metabólica celular é avaliada pela atividade das desidrogenases, o que por sua vez é uma medida da respiração mitocondrial das células (Selimović-Dragaš et al., 2012).

Este teste é usado largamente como indicador da viabilidade celular, graças à produção de um produto, o formazano, que é insolúvel em água. Assim, para o dissolver é necessário utilizar um solvente orgânico, o DMSO (dimetil sulfóxido), para que o formazano possa ser dissolvido (Ishiyama et al., 1996).

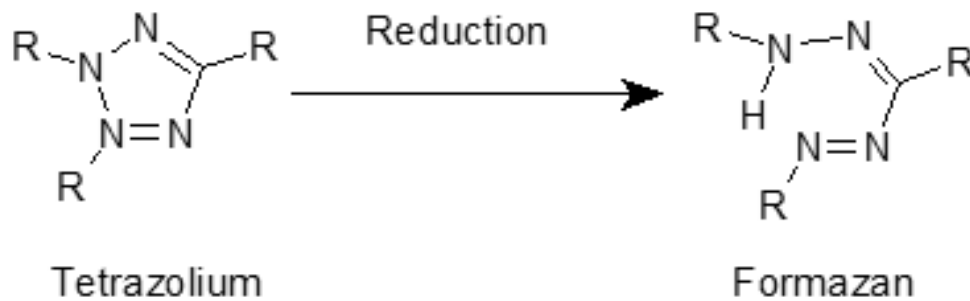


Figura 3. Ilustração relativa à formação do produto formazano (Stockert, et al. 2012).

Segundo Borenfreund et al (1988), o ensaio do MTT é baseado na redução da substância de cor amarela (sal de tetrazólio) numa substância de cor azul (formazano). Tudo isto é realizado por desidrogenases succínicas das mitocôndrias, que fazem a biorredução. Este ensaio é ideal para quando, após terem sido semeadas células e estas terem atingido um nível de confluência por volta dos 60-70% aquando da inoculação com os materiais citotóxicos, se pretende medir o efeito citostático (isto é, o que inibe o crescimento celular) destes materiais.

Esta atividade mitocondrial provoca um sinal forte, sugerindo que os cristais de formazano formados ao nível de cada uma das células dependem do metabolismo energético. Acresce a todos estes factores que o teste do MTT permite ainda a deteção de células viáveis.

A produção de formazano é diretamente proporcional ao número de células existentes por poço e pode ser usado para detetar a presença de um número de células vivas. Células que sejam metabolicamente inativas não produzem uma quantidade significativa de formazano. Assim, compreende-se que a quantidade de formazano produzida por célula num determinado período de tempo, é dependente da sua atividade metabólica. (Mosmann, T. 1983).

A produção de formazano é proporcional ao número de células existentes, demorando entre 30 minutos e duas horas a ficar completa (Denizot & Lang, 1986).

A sua formação também é proporcional à concentração de MTT existente no meio de cultura (Vistica et al., 1991).

Uma das vantagens do uso deste teste colorimétrico é que ele permite um rápido processamento ao nível das suas amostras (Chaves, C. 2009).

Schmalz (1994) efectuou uma revisão da literatura relativamente ao tema das vantagens e limitações ao uso de culturas celulares para testes de citotoxicidade *in vitro*, tendo referido que existem essencialmente três componentes a considerar. São eles: o sistema biológico usado, o contacto do material com a cultura celular e avaliação do aspecto biológico final e, ainda, os sistemas que foram utilizados visando alcançar o objetivo. Os sistemas biológicos incluem células e organitos celulares, bem como cultura de órgãos ou, então, a mais utilizada para testar os materiais dentários, a cultura de células (tanto de linhagem permanente, como de cultura primária).

Já o contacto pode ser realizado de forma direta, indireta ou através de extratos, sendo que a avaliação dos resultados obtidos depende da morfologia celular, bem como dos efeitos na membrana celular, atividade celular e taxa de proliferação. (Chaves, C. 2009).

Estes resultados só podem ser interpretados dentro da mesma categoria de um determinado material, permitindo assim uma análise relativa da citotoxicidade, visto que a comparação e extrapolação de resultados obtidos para a prática clínica não é possível (Chaves, C. 2009).

Assim, segundo o mesmo autor, quando se realizam estudos *in vivo*, conseguimos demonstrar uma relação de causalidade, mas não conseguimos explicar os mecanismos que a induziram. Compreende-se então que, nesse campo, os testes *in vitro* possam esclarecer esses mecanismos separadamente, já que diferentes aspetos do sistema *in vivo*, bastante complexo, podem ser estudados através do método *in vitro*.

É sugerido por Yoshii (1997) que a citotoxicidade do monómero metilmetacrilato é determinada pela sua lipossolubilidade, o que causa a sua incorporação na membrana celular, nomeadamente na sua bicamada fosfolipídica, ou então pela solubilização dos lípidos dessas mesmas membranas.

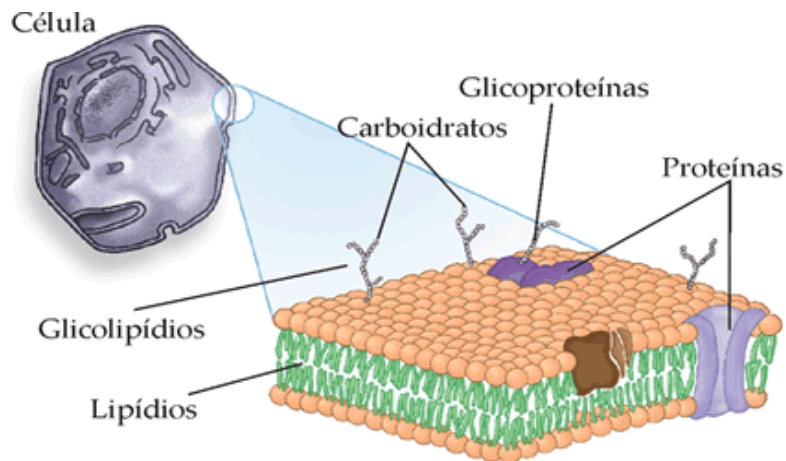


Figura 4. Representação da bicamada fosfolipídica das células (<http://www.sobiologia.com>).

A morte celular tem sido descrita como um fenómeno que pode ocorrer de duas formas distintas. Uma delas é por apoptose celular e a outra, por necrose celular. Na apoptose celular ocorre morte celular fisiológica, isto é, é mantida a integridade das membranas dos organitos celulares e da membrana plasmática. A apoptose processa-se sem a presença de resposta inflamatória.

Na necrose celular, ocorre um processo passivo, no qual, após a célula ter sido alvo de uma agressão, ocorre um aumento no tamanho das mitocôndrias com ruptura da membrana celular, e conseqüente libertação de conteúdo citoplasmático, registando-se uma resposta inflamatória (Chaves, C. 2009).

Por isso, Cimpan et al (2000) consideraram importante a identificação do padrão de morte celular na avaliação do grau de citotoxicidade. Para esta avaliação do grau de citotoxicidade, o teste do MTT torna-se indispensável. Considera-se que a redução feita pelas desidrogenases, na qual o MTT é reduzido para o seu produto, o formazano, é realizada no interior da mitocôndria, tornando assim o teste do MTT um indicador da função mitocondrial, pelo que é assim possível medir a função da mitocôndria (Huet, Petit, Ratinaud & Julien, 1992; Nikkhah et al., 1992; Van de Sandt et al., 1993; Bednarska et al., 1998; Bruzell, Morisbak & Tønnesen, 2005; Feuerstein, Schauder & Malik, 2005; Van Meerloo, Kaspers & Cloos, 2011).

Um estudo realizado por Stockert (2012) com recurso à observação microscópica direta, demonstrou que o produto do MTT, o formazano, encontrava-se localizado num dos locais principais para a acumulação do formazano: as gotículas lipídicas.

Também é referido neste mesmo estudo que o poder de redução deriva essencialmente do NADH.

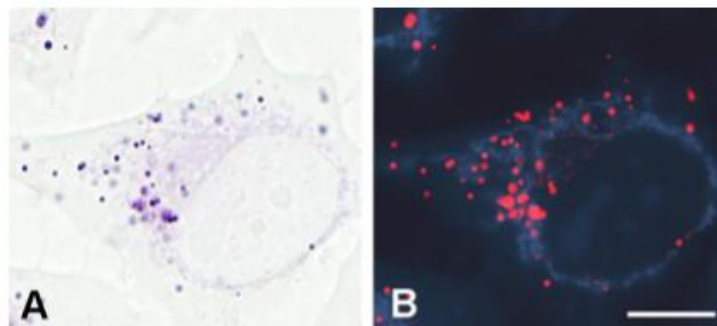


Figura 5. Imagens de grânulos de formazano (à esquerda) e as imagens correspondentes, com autofluorescência da mitocôndria imediatamente após o tratamento com o MTT (Stockert, 2012).

Segundo Berridge, Herst & Tan, 2005, a formação do produto do MTT, o formazano, depende sobretudo, do ritmo da produção de NADH pela via glicolítica, sendo que é esta a coenzima que viabiliza a redução do MTT.

Os sais de tetrazólio podem estar envolvidos na redução do MTT para formazano, graças à atividade da NADPH oxidase, existindo ainda um outro mecanismo que poderá contribuir para a formação de cristais de formazano extracelulares (Honoré, Kovacic, Pichard, Briand & Rognoni, 2013).

Uma das desvantagens do teste do MTT é a da retenção do produto formazano no interior das células, o que pode induzir em erro na leitura da sobrevivência celular, sobretudo quando a linha celular é incubada com uma alta concentração de produto tóxico (Borenfreund & Martin-Alguacil, 1988).

Outra desvantagem do ensaio do MTT é o facto das células, devido à formação do formazano, não poderem ser reutilizadas em nenhum outro ensaio. Contudo, o meio de cultura com o tóxico poderá ser reutilizado para outros ensaios de MTT, se necessário (Morgan, 1997).

Hipóteses Experimentais

Hipótese nula: relativamente aos testes de citotoxicidade efetuados quando a linha celular 3T3 de fibroblastos de ratinho se encontra em contacto com os monómeros metilmetacrilato, bisfenol-A glicidil metacrilato e dimetilmetacrilato de uretano, não são expectáveis diferenças na viabilidade celular.

Hipótese Experimental: relativamente aos testes de citotoxicidade efetuados quando a linha celular 3T3 de fibroblastos de ratinho se encontra em contacto com os monómeros metilmetacrilato, bisfenol-A glicidil metacrilato e dimetilmetacrilato de uretano, são expectáveis diferenças na viabilidade celular.

Materiais e Métodos

Antes de serem enumerados os materiais específicos utilizados para realizar esta investigação científica, há que referir primeiramente o equipamento utilizado que se encontra no Laboratório Biologia Molecular e na Sala de Cultura de Células, nomeadamente:

- ✓ Leitor de Microplacas, model 680. Bio Rad, Califórnia.
- ✓ Microscópio Óptico Invertido, Axiovert 25. Zeiss, EUA.
- ✓ Câmara de Fluxo Laminar MarsSafetyClass 2. LaboGene, Dinamarca.
- ✓ Câmara de Neubauer, modelo 8100104. Hirschmann, Alemanha.
- ✓ Centrifugadora, modelo 3-16K. Sigma.
- ✓ Incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO₂. Jacketed Incubator. Shel Lab.
- ✓ Micropipetas do tipo Gilson
- ✓ Pipetador automático
- ✓ Pipetador automático com 9 canais
- ✓ Balança de precisão

Durante este trabalho foi utilizado material descartável, onde se incluem microplacas de 96 poços, tubos “Falcon” de 15 ml e 50ml, frascos para cultivar células (T25), bem como pontas estéreis para micropipetas e pipetas.

Os reagentes utilizados neste trabalho são os tabelados abaixo:

| Nome do Reagente | Fonte | Nº Produto |
|---|-----------------------|------------|
| Etanol | Merck, Estados Unidos | |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Sigma, Reino Unido | |
| Brometo 3- [4,5 dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, 99% | Sigma, Reino Unido | M5655 |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM). Filtrado, esterilizado e testado para endotoxinas. | Sigma, Reino Unido | D5671 |
| Tripsina de pâncreas suíno. Filtrado e esterilizado, 10% | Sigma, Reino Unido | 15090046 |
| <i>Fetal Bovine Serum</i> , (FBS), filtrado e esterilizado. Testado para endotoxina e hemoglobina. | Sigma, Reino Unido | F4135 |
| Solução L-glutamina-penicilina-streptomicina (200mM L-glutamina, 100000 U/mL penicilina e 10 mg/ml streptomicina). Filtrada e esterilizada. | Sigma, Reino Unido | A2942 |

| | | |
|--|--------------------|-----------|
| Gentamicina 50 mg/ml | Gibco, Reino Unido | 15750037 |
| Solução de Tripán azul (0,4%). Filtrado e esterilizado. | Sigma, Reino Unido | T8154 |
| Solução de anfotericina B, 250 ug/ml (fungizona). Filtrado e esterilizado | Sigma, Reino Unido | G6784 |
| <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS, tampão fosfato) | Gibco, Reino Unido | 70013-016 |
| Non essential Amino Acid Solution (DMEM). Filtrado e esterilizado. Testado para endotoxinas. | Sigma, Reino Unido | M7145 |

Foram ainda utilizados outros materiais neste trabalho, designadamente os monómeros de Bisfenol-A glicidil metacrilato, o dimetacrilato de uretano e metilmetacrilato que foram postos em contacto com as linhas celulares 3T3 para avaliar o grau de citotoxicidade.

| Monómero | Marca | Nº produto |
|---------------------------------|---------------|--------------|
| Metilmetacrilato | Sigma-Aldrich | M55909-25ML |
| Bisfenol-A glicidil metacrilato | Sigma-Aldrich | 455059-500ML |
| Dimetacrilato de Uretano | Sigma-Aldrich | 436909-100ML |

Soluções Stock

Foram feitas soluções de diferentes concentrações de tóxico para cada monómero, pelo que foram feitas três soluções stock (stock 1,2 e 3).

Para o metilmetacrilato, foram pipetados 427 μl directamente do frasco para 99,573 ml de H_2O , por forma a obter um volume final de 100 ml. Esta solução ficou designada como sendo o stock 1 de metilmetacrilato, com a concentração final de 1 mM.

Para fazer o stock 2 de metilmetacrilato, foram retirados 100 μl do stock 1, tendo sido acrescentado mais 9.9 ml de H_2O , ficando à concentração final de 10 μM .

Para fazer o stock 3 de metilmetacrilato, foram retirados 100 μl do stock 2, tendo sido acrescentado mais 9.9 ml de H_2O , ficando à concentração final de 0,1 μM .

Já para o bisfenol A glicidil metacrilato, foram pipetados 1350 μl directamente do frasco, para 98,650 ml de H_2O , por forma a obter um volume final de 100 ml. Esta solução ficou designada como sendo o stock 1 de bisfenol A glicidil metacrilato, com a concentração final de 1 mM.

Para fazer o stock 2 de bisfenol A glicidil metacrilato, foram retirados 100 μl do stock 1 de bisfenol A glicidil metacrilato, tendo sido acrescentada o mais 9.9 ml de H_2O , ficando à concentração final 10 μM .

Para fazer o stock 3 de bisfenol A glicidil metacrilato, foram retirados 100 μl do stock 2, tendo sido acrescentado mais 9.9 ml de H_2O , ficando à concentração final de 0,1 μM .

Para o dimetacrilato de uretano, foram pipetados 1695 μl directamente do frasco para 98,305 ml de uma solução de acetonitrilo (25%) e etanol (75%), por forma a obter um

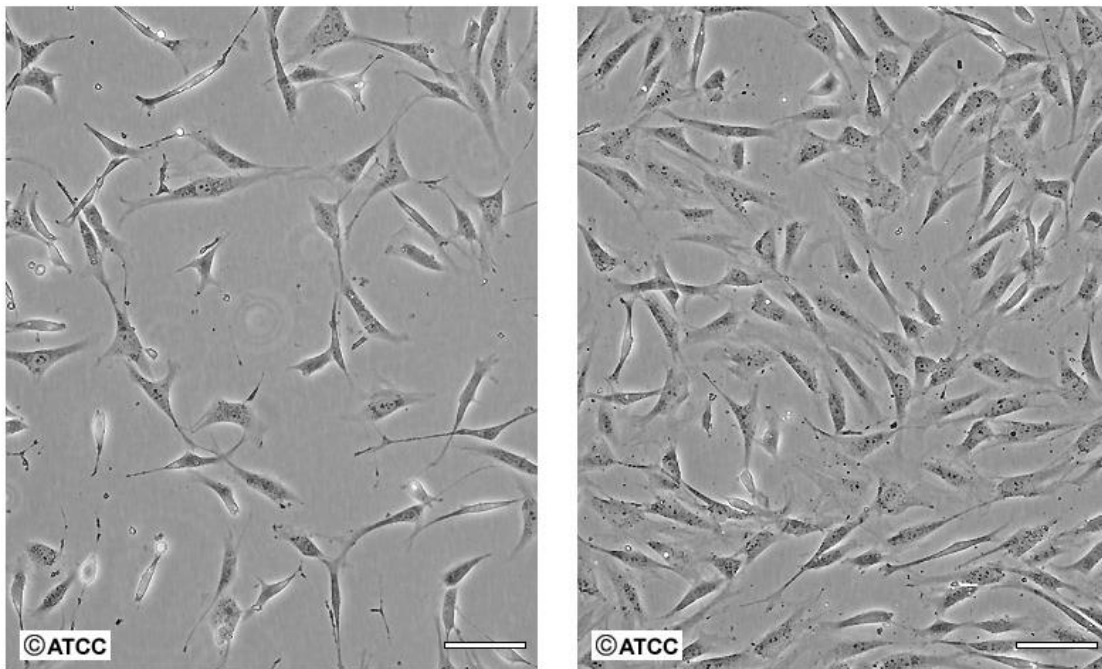
volume final de 100 ml. Esta solução ficou designada como sendo o stock 1 de dimetacrilato de uretano, com a concentração final de 1 mM.

Para fazer o stock 2 de dimetacrilato de uretano, foram retirados 100 μ l do stock 1 de dimetacrilato de uretano, tendo sido acrescentado mais 9.9 ml da solução de etanol e acetonitrilo, ficando à concentração final de 10 μ M.

Para fazer o stock 3 de dimetacrilato de uretano foram retirados 100 μ l do stock 2 de dimetacrilato de uretano, tendo sido acrescentado mais 9.9 ml da solução etanol e acetonitrilo, ficando à concentração final de 0,1 μ M.

Cultura de células

Figura 6. Linha celular 3T3 de fibroblastos de embrião de rato ([www.http://www.lgcstandards-atcc.org](http://www.lgcstandards-atcc.org))



Neste trabalho foram utilizadas fibroblastos 3T3 de ratinho.

Estas foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10 % de soro FBS.

As células encontravam-se congeladas a -80°C , e foram descongeladas à temperatura de 37°C e foi adicionado meio de cultura DMEM suplementado. As células foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos para retirar o DMSO necessário para manter a integridade das células guardadas a -80°C . O pellet de células foi ressuspensão em 4 ml de meio completo.

As células foram postas a crescer num frasco de cultura T25, ao qual ainda foram adicionados mais 4 ml de DMEM, ficando a incubar a 37°C , com atmosfera humidificada com 5% de CO_2 , tendo-se procedido à substituição do meio a cada três dias.

As células em cultura ficaram a incubar até que as mesmas aderissem à superfície lateral do frasco de cultura e se multiplicassem até alcançar valores entre os 80% - 90% de confluência.

As células aderentes foram lavadas com PBS (por duas vezes), seguindo-se a tripsinização (cujas ação é promover a hidrólise das proteínas de adesão, para descolar as células aderentes às paredes do frasco de cultura).

A partir daqui obtivemos uma suspensão celular, suspensão essa que foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi ressuspensão em 3 ml de DMEM completo.

Após esse procedimento, foi acrescentado a 10 μl de células, 10 μl de azul de tripano, para efectuar a contagem de células na câmara de Neubauer, da Hirschmann. A fórmula utilizada para contagem foi a seguinte:

✓ $\text{N}^{\circ} \text{ células/mL} = (\text{média do n}^{\circ} \text{ de células por quadrante (4 contagens/4)} \times \text{factor diluição} \times 10^4)$

A partir do valor obtido foi utilizada uma percentagem de células para fazer subculturas.

Experiências

Nesta investigação o que se pretende é colocar em contacto as células os três monómeros para avaliar toxicidade de cada um deles.

Para a realização deste trabalho foram efectuadas duas experiências independentes, utilizando diferentes diluições dos 3 monómeros, com oito réplicas para cada diluição.

As células foram distribuídas por 96 poços (4×10^3 células/poço em 200 μ l de meio de cultura), e ficaram durante 24h na estufa a 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂ para aderirem às paredes do poço da placa de cultura.

As células restantes foram colocadas num criotubo onde foi também adicionado 10% de DMSO ao meio de cultura, e seguidamente armazenadas a -80°C (de forma a manter a viabilidade das células para futuras utilizações).

Passadas 24 horas, foi retirado o meio que tinha estado em contacto prévio com as células e substituído por 195 μ l de meio completo com 5 μ l de cada uma das soluções stock, 1,2,e 3, ficando os monómeros em contacto com as células à concentração final de 1 mM, 10 μ M e 0,1 μ M.

As diluições de monómeros antes de serem colocadas em contacto com as células foram filtradas através de filtros de celulose, cujo diâmetro é de 0,45 μ m, no fluxo laminar, em condições de esterilidade.

Na microplaca, foi utilizada uma coluna como controlo positivo, em que os 8 poços continham células em 200 μ l de DMEM completo sem tóxico.

Noutras duas colunas de controlo foram adicionados aos 195 µl de meio, 5 µl das soluções de etanol a 75%, e etanol 75% e acetonitrilo 25%, que ficaram às concentrações finais de 1,87% etanol, e 5,6% etanol mais 1,87 % acetonitrilo.

Foram colocados 5 µl das várias diluições de monómeros em DMEM em contacto com as células aderentes aos poços e após 24 horas de incubação, foram retiradas e substituídas, em cada poço da microplaca, por 200 µl de solução MTT.

O método utilizado para quantificar a viabilidade celular foi o ensaio do MTT.

O seu princípio consiste na avaliação da actividade metabólica das células, quantificando assim a redução do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), graças à acção de desidrogenases que, em associação com o NADPH e NADH, formam no interior das células cristais de formazano. Este composto tem por característica ser de coloração azul-escura, insolúvel em água, e fica armazenado no citoplasma celular.

Isto é possível, devido ao facto de as desidrogenases estarem presentes apenas na membrana interna da mitocôndria de células viáveis. Assim, o número de células vivas está directamente relacionado com a quantidade de formazano formado (após contacto das células com o agente tóxico).

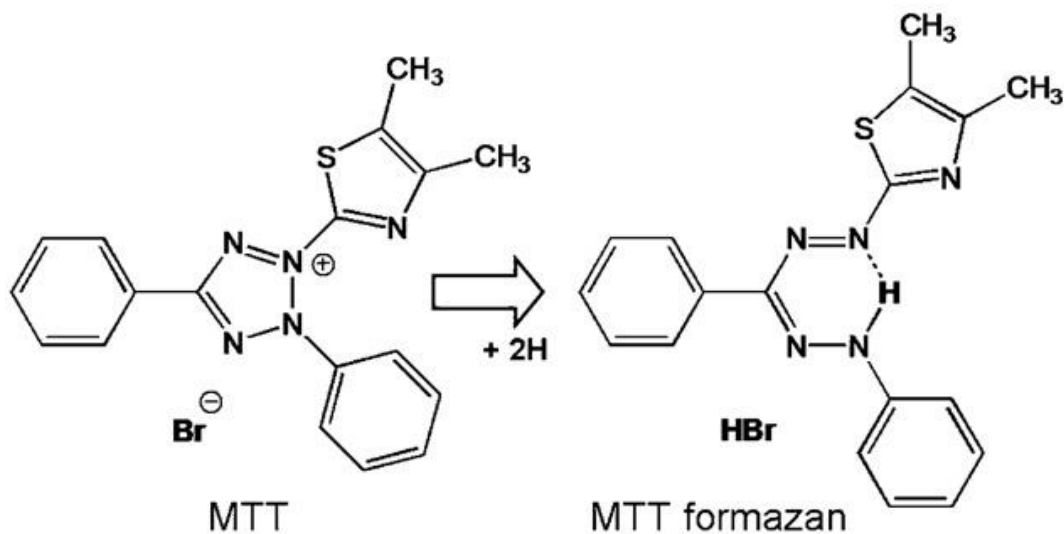


Figura 7. Estrutura química do MTT e formação de formazano (Stockert, et al. 2012).

Estes cristais de formazano são intensamente coloridos e podem ser quantificados com recurso a espectrofotómetro, após terem sido dissolvidos por um solvente orgânico, o DMSO.

O protocolo utilizado para o ensaio de MTT durante este trabalho foi o seguinte:

- 1- Remoção do meio e lavagem dos poços com 100 µl de meio de cultura.
- 2- Adição de 200 µl de solução MTT por poço à concentração de 0.5 mg/ml.
- 3- Colocar a placa na estufa (a 37°C, com uma atmosfera humidificada de CO₂ a 5%), durante 2h.
- 4- Remoção da solução de MTT e lavagem com PBS.
- 5- Secar através da inversão da placa, com absorção do líquido através de papel (fazer esta etapa cuidadosamente para evitar desprendimento das células da placa e também que estas sejam absorvidas pelo papel).
- 6- Adição de 200 µl de DMSO para solubilização dos cristais de MTT.
- 7- Posterior leitura da placa num leitor de microplacas (Bio-Rad). O comprimento de onda utilizado para efectuar a leitura foi de 590 nm.

Os valores de absorvância dos poços correspondentes às culturas designadas como controlo positivo correspondam a 100% de viabilidade, ou seja, as células que foram incubadas apenas com meio de cultura sem terem sido expostas aos agentes tóxicos.

Então, a fórmula que nos permite calcular a percentagem de viabilidade celular é:

✓ % viabilidade celular = (média de células em contacto com o tóxico/ média de células do grupo de controlo) x 100.



Figura 8. Exemplo de fotografia de uma placa após realização do teste de MTT (<http://www.antineo.fr>).

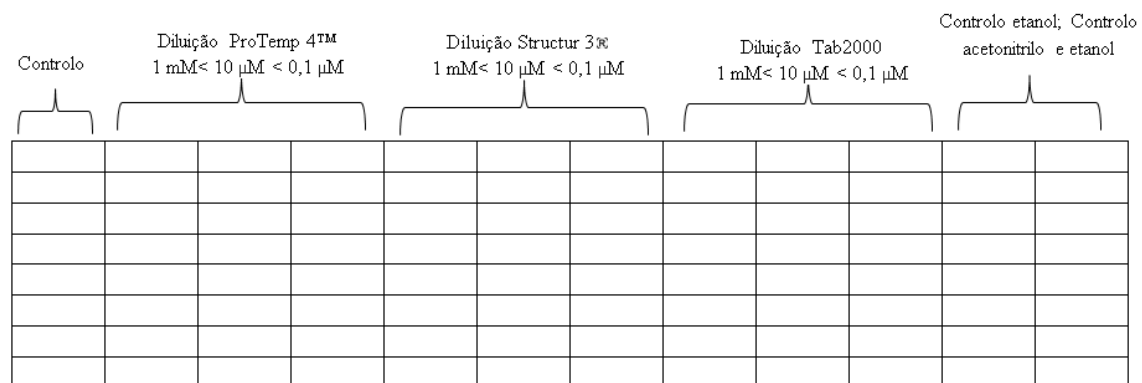


Figura 9. Exemplo do esquema utilizado para microplaca.

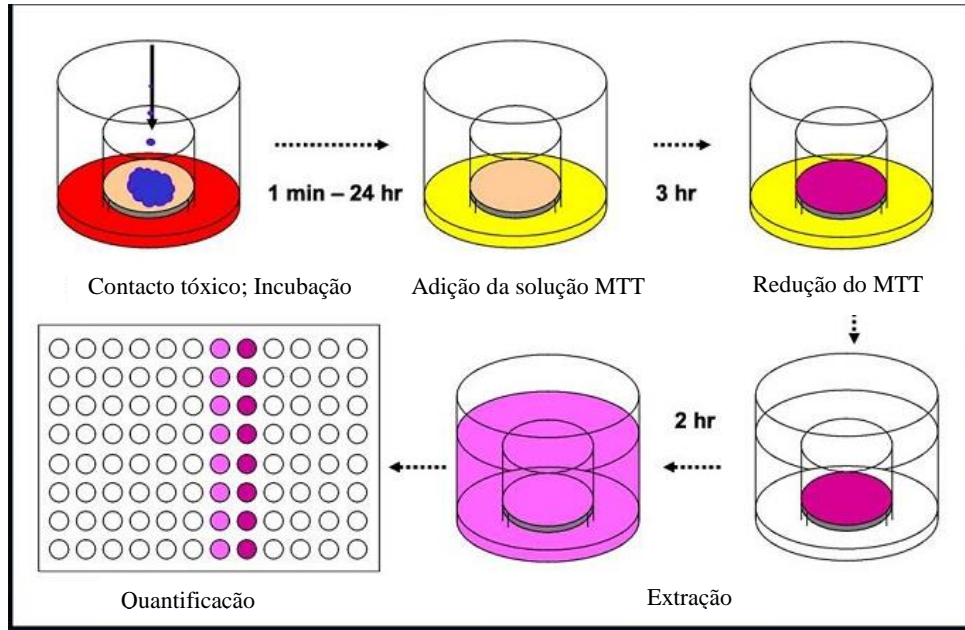


Figura 10. Esquema representativo das várias etapas do ensaio do MTT efectuados (<http://www.iivs.org>)

Análise de dados estatísticos

Tendo em conta o trabalho desenvolvido por esta investigação científica, procedeu-se a análise estatística com recurso ao programa *Statistical Package Social Sciences* (SPSS), versão 22.0 para Windows.

Para efeitos da referida análise estatística, foi utilizado o teste Anova, bem como a correção de Welch. Com recurso a este teste, podemos comparar mais de dois grupos e as suas variáveis dependentes. Utilizou-se a correção de Welch quando não se verificou a homogeneidade de variâncias.

Foi também utilizado o teste de Tamhane, para comparação múltipla. Este teste permite avaliar se há diferenças estatísticas relevantes nos resultados obtidos. Neste âmbito, (α) <0,05 foi o nível de significância estabelecido para esta análise.

Resultados

Teste de citotoxicidade de extratos

Para verificar o grau de toxicidade de diferentes monómeros utilizámos o teste de viabilidade celular do MTT.

Os monómeros testados foram o MMA, que designámos por M1, Bis-GMA, que designámos por M2 e UDMA, que designámos por M3. Nos ensaios utilizaram-se diferentes concentrações dos monómeros que foram previamente solubilizados em água, no caso do MMA e do Bis-GMA, e numa solução de etanol 75% e acetonitrilo 25% no caso do UDMA, com a concentração de 40mM, dada a sua insolubilidade em água. As diluições de cada monómero foram as seguintes:

Tabela 1. Diluições e respetivas concentrações para os monómeros M1,M2 e M3.

| Diluições | Monómero M1 | Monómero M2 | Monómero M3 |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 1 mM | 1 mM | 1 mM |
| 1:100 | 10 μ M | 10 μ M | 10 μ M |
| 1:10000 | 0,1 μ M | 0,1 μ M | 0,1 μ M |

Os monómeros foram incubados durante 24 horas em meio DMEM e previamente filtrados antes de postos em contacto com as células 3T3. Simultaneamente, 4×10^3 células foram semeadas em cada poço e incubaram durante 24 horas para aderirem ao fundo dos poços da microplaca. Após estas 24 horas, as diferentes concentrações de monómeros foram postas em contacto com as células e incubaram durante mais 24h, para permitir a duplicação das células.

Em seguida, o meio de incubação foi substituído pela solução de MTT e o ensaio foi realizado como descrito anteriormente.

Os valores obtidos após a redução dos sais de formazano foram usados para calcular a percentagem de viabilidade celular e estão apresentados de seguida:

Tabela 2. Resultados obtidos após a primeira experiência.

| MMA | | | Bis-GMA | | | UDMA | | |
|-------|-------|--------|---------|-------|--------|-------|-------|--------|
| 1 mM | 10 mM | 0,1 mM | 1 mM | 10 mM | 0,1 mM | 1 mM | 10 mM | 0,1 mM |
| 77,08 | 61,05 | 75,13 | 30,26 | 68,28 | 55,65 | 9,60 | 68,94 | 83,28 |
| 77,34 | 67,50 | 50,00 | 27,63 | 82,23 | 50,52 | 10,26 | 71,97 | 80,92 |
| 70,93 | 61,31 | 73,02 | 28,15 | 81,18 | 63,15 | 11,05 | 70,26 | 84,34 |
| 64,51 | 62,63 | 63,94 | 28,28 | 76,05 | 76,97 | 10,52 | 68,55 | 83,28 |
| 56,57 | 57,23 | 65,92 | 28,68 | 72,63 | 55,78 | 11,31 | 57,23 | 78,55 |
| 53,42 | 52,89 | 61,84 | 25,00 | 61,97 | 58,81 | 9,73 | 65,52 | 71,31 |
| 64,21 | 65,00 | 54,34 | 27,23 | 62,76 | 32,90 | 9,60 | 62,76 | 76,71 |
| 61,44 | 64,64 | 41,44 | 24,07 | 53,02 | 41,31 | 10,52 | 65,78 | 77,36 |

Tabela 3. Resultados obtidos após a segunda experiência.

| MMA | | | Bis-GMA | | | UDMA | | |
|-------|-------|--------|---------|-------|--------|------|-------|--------|
| 1 mM | 10 mM | 0,1 mM | 1 mM | 10 mM | 0,1 mM | 1 mM | 10 mM | 0,1 mM |
| 63,70 | 60,67 | 62,92 | 24,04 | 63,25 | 47,52 | 8,65 | 64,94 | 69,88 |
| 51,57 | 58,76 | 47,86 | 23,93 | 45,39 | 46,74 | 9,49 | 49,21 | 72,02 |
| 66,06 | 55,05 | 54,71 | 24,60 | 36,74 | 63,37 | 8,76 | 64,04 | 66,44 |
| 47,30 | 52,13 | 60,22 | 32,47 | 34,38 | 48,87 | 7,64 | 63,70 | 71,57 |
| 52,58 | 66,96 | 60,44 | 22,24 | 51,23 | 55,16 | 6,74 | 52,80 | 65,28 |
| 49,32 | 49,43 | 51,57 | 21,23 | 55,39 | 53,59 | 6,51 | 87,75 | 60,78 |
| 55,28 | 57,52 | 55,84 | 26,29 | 48,53 | 50,22 | 7,75 | 54,49 | 65,73 |
| 56,17 | 49,32 | 46,51 | 31,34 | 51,12 | 36,40 | 7,07 | 55,95 | 66,17 |

E também sob a forma de gráfico, na figura seguinte:

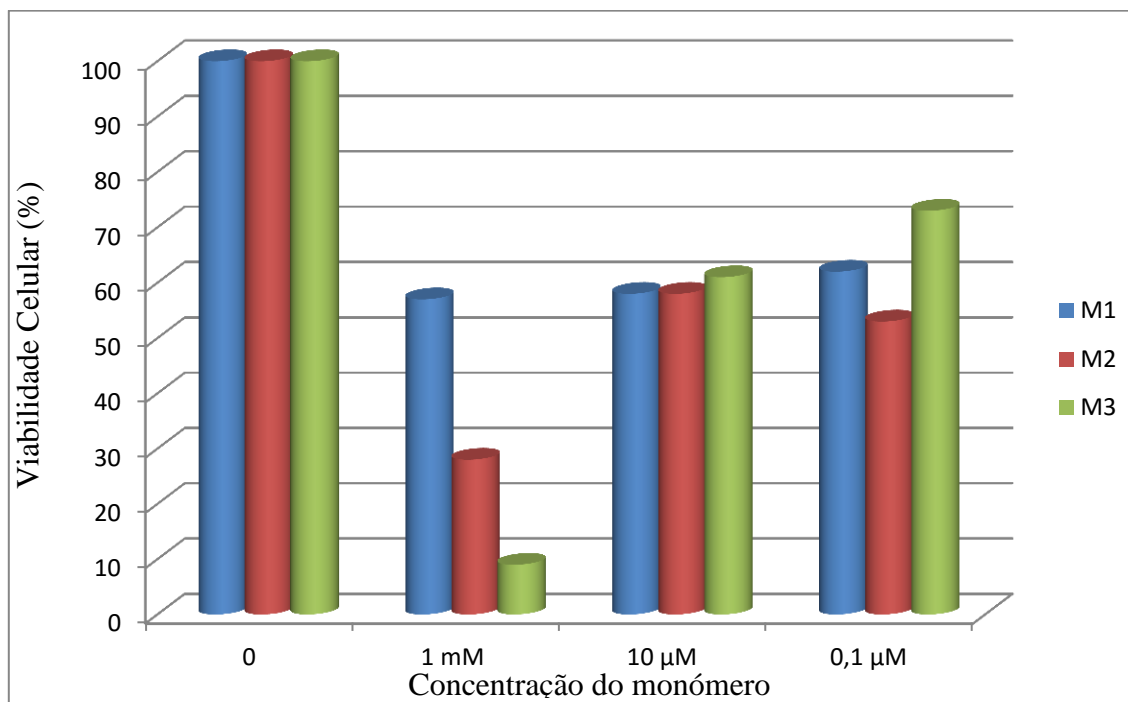


Gráfico 1. Gráfico ilustrativo da viabilidade celular das células 3T3, após contacto com diferentes diluições de monómeros MMA, Bis-GMA e UDMA, durante 24h.

Para saber se as diferenças observadas na viabilidade das células expostas aos diferentes monómeros são estatisticamente significativas, foi usado o teste Anova One-Way, com correção de Welch, para o qual o nível de significância é de <0.05 . Assim, pretendemos avaliar a importância estatística dos valores obtidos de cada diluição de monómero.

O grupo de controlo positivo (0 mM) corresponde a 100% de viabilidade celular.

Na constituição deste grupo, não estava presente nenhum tipo de monómero, ou seja as células do grupo de controlo positivo foram apenas cultivadas em meio de cultura (DMEM).

Os restantes grupos estiveram em contacto com soluções de monómeros durante 24h e, após o teste do MTT, conforme se pode verificar no gráfico 1, podemos afirmar que os três monómeros são citotóxicos, sobretudo nas suas concentrações mais altas (M2 e M3).

Assim, a título de comparação, podemos afirmar que M1 é menos citotóxico, já que apresenta maior percentagem de viabilidade celular que M2.

Também podemos afirmar que existe uma baixa percentagem de crescimento celular no caso do monómero M3, sobretudo à concentração de 1mM.

Ainda em relação ao M3, este é o mais citotóxico dos três monómeros, uma vez que a taxa de viabilidade celular diminui, aquando da exposição ao agente tóxico, na solução com maior concentração de monómero.

Monómero Metilmetacrilato (M1) – Ensaio de 24h

Tabela 4. Valores de absorvância do monómero M1, obtidos após primeira experiência.

| 1 mM | 10 µM | 0,1 µM |
|------|-------|--------|
| 0,57 | 0,54 | 0,56 |
| 0,46 | 0,523 | 0,426 |
| 0,59 | 0,49 | 0,487 |
| 0,42 | 0,464 | 0,536 |
| 0,47 | 0,596 | 0,538 |
| 0,44 | 0,498 | 0,459 |
| 0,49 | 0,512 | 0,497 |
| 0,50 | 0,439 | 0,414 |

Tabela 5. Valores de absorvância do monómero M1, obtidos após a segunda experiência.

| 1 mM | 10 μ M | 0,1 μ M |
|-------|------------|-------------|
| 0,589 | 0,464 | 0,571 |
| 0,591 | 0,513 | 0,38 |
| 0,542 | 0,466 | 0,555 |
| 0,493 | 0,476 | 0,486 |
| 0,43 | 0,435 | 0,501 |
| 0,406 | 0,402 | 0,470 |
| 0,488 | 0,494 | 0,413 |
| 0,467 | 0,494 | 0,315 |

Relativamente ao monómero M1, como podemos comprovar pelos gráficos em baixo (gráfico 2 e tabela 6), existem diferentes níveis de viabilidade celular, conforme a concentração de tóxico administrado à cultura celular, já que a diluição de 0,1 μ M apresenta maior viabilidade celular, por comparação com a diluição de 1 mM, que apresenta menor viabilidade celular.

Contudo, o facto de os resultados não serem estatisticamente diferentes entre si, demonstra que a viabilidade celular não é afetada pela quantidade de extrato aplicado.

No entanto, os resultados são estatisticamente diferentes em comparação com o controlo, sugerindo assim que o monómero M1 causa morte celular, só que esta ocorre independentemente da sua concentração.

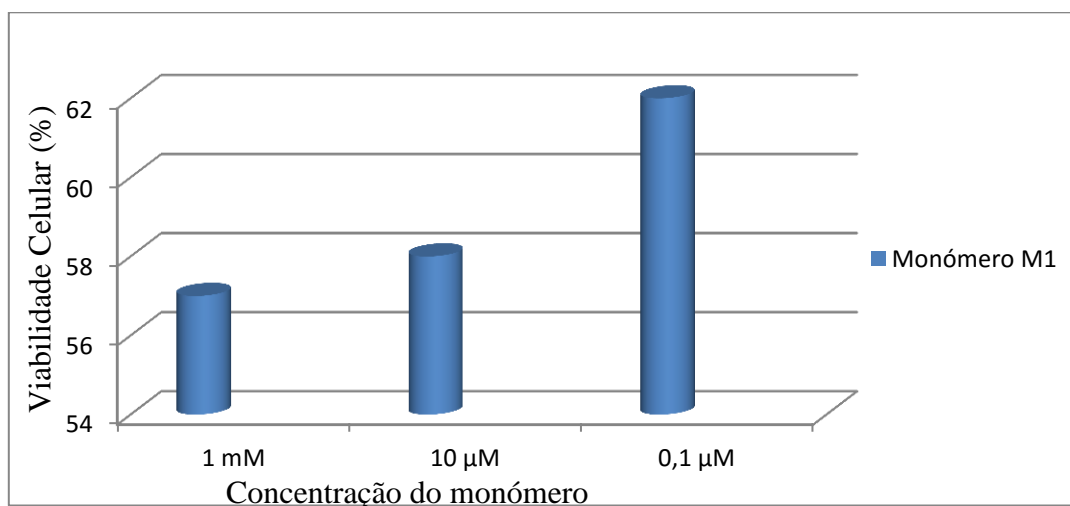


Gráfico 2. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições do monómero M1, resultante do teste do MTT.

Tabela 6. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições do monómero M1, resultante do teste do MTT e desvio-padrão.

a e b são os subgrupos homogêneos.

| Material Usado | Experiência efetuada | Concentração 1 mM | Concentração 10 µM | Concentração 0.1 µM | Valor Significância |
|----------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|
| Monómero M1 | Teste do MTT | 57,55 ^a ±2,32 | 58,99 ^a ±5,38 | 62,62 ^a ±11,59 | <0.01 |

Monómero Bisfenol-A glicidil metacrilato (M2) – Ensaio de 24h

Tabela 7. Valores de absorvância do monómero M2, obtidos após a primeira experiência.

| 1 mM | 10 µM | 0,1 µM |
|------|-------|--------|
| 0,23 | 0,519 | 0,423 |

| | | |
|-------|-------|-------|
| 0,21 | 0,625 | 0,384 |
| 0,214 | 0,617 | 0,48 |
| 0,215 | 0,578 | 0,585 |
| 0,218 | 0,552 | 0,424 |
| 0,19 | 0,471 | 0,447 |
| 0,207 | 0,477 | 0,433 |
| 0,183 | 0,403 | 0,314 |

Tabela 8. Valores de absorvância do monómero M2, obtidos após a segunda experiência.

| 1 mM | 10 μ M | 0,1 μ M |
|-------|------------|-------------|
| 0,214 | 0,563 | 0,423 |
| 0,213 | 0,404 | 0,416 |
| 0,219 | 0,327 | 0,564 |
| 0,289 | 0,306 | 0,435 |
| 0,198 | 0,456 | 0,491 |
| 0,189 | 0,493 | 0,477 |
| 0,234 | 0,432 | 0,447 |
| 0,279 | 0,455 | 0,324 |

O monómero M2, como podemos comprovar pelos gráficos em baixo (gráfico 3 e tabela 9), tem o seu valor de viabilidade celular mais elevado com a concentração de 10 μ M, sendo a concentração de 1mM correspondente ao valor mais baixo de viabilidade celular. Podemos afirmar que o monómero M2 causa morte celular conforme a quantidade de extracto que é aplicado, ou seja, a sua citotoxicidade é dependente da sua concentração.

Já as diluições de 10 μ M e 0,1 μ M não são estatisticamente diferentes entre si.

Os resultados são estatisticamente diferentes em comparação com o controlo, sugerindo assim que o monómero M2 causa morte celular.

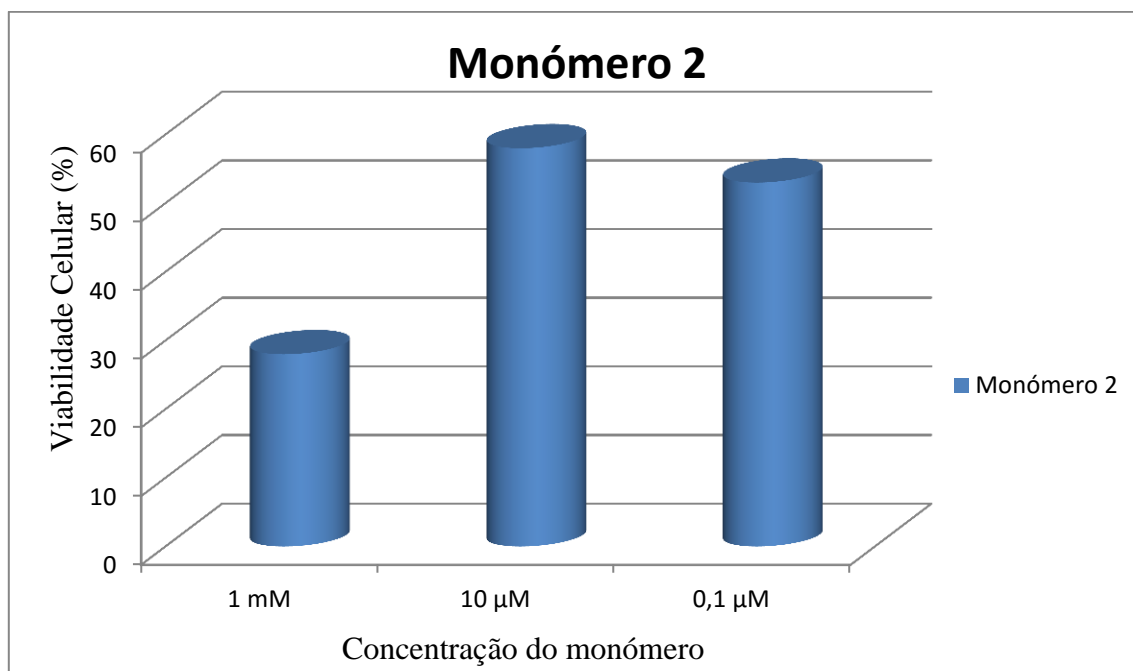


Gráfico 3. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições do monómero M2, resultante do teste do MTT.

Tabela 9. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições do monómero M2, resultante do teste do MTT e desvio-padrão.

a e b são os subgrupos homogêneos.

| Material Usado | Experiência efectuada | Concentração 1 mM | Concentração 10 μ M | Concentração 0.1 μ M | Valor Significância |
|----------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Monómero M1 | Teste do MTT | 53,53 ^a \pm 9,45 | 58,69 ^b \pm 4,53 | 28,19 ^b \pm 7,00 | <0.01 |

Monómero Dimetacrilato de Uretano (M3) – Ensaio de 24h

Tabela 10. Valores de absorvância do monómero M3, obtidos após a primeira experiência.

| 1 mM | 10 μ M | 0,1 μ M |
|-------|------------|-------------|
| 0,073 | 0,524 | 0,633 |
| 0,078 | 0,547 | 0,615 |
| 0,084 | 0,534 | 0,641 |
| 0,08 | 0,521 | 0,633 |
| 0,086 | 0,435 | 0,597 |
| 0,074 | 0,498 | 0,542 |
| 0,073 | 0,477 | 0,583 |
| 0,08 | 0,5 | 0,588 |

Tabela 11. Valores de absorvância do monómero M3, obtidos após a segunda experiência.

| 1 mM | 10 µM | 0,1 µM |
|-------|-------|--------|
| 0,077 | 0,578 | 0,622 |
| 0,075 | 0,438 | 0,641 |
| 0,078 | 0,57 | 0,598 |
| 0,068 | 0,567 | 0,637 |
| 0,06 | 0,47 | 0,581 |
| 0,058 | 0,43 | 0,541 |
| 0,069 | 0,485 | 0,585 |
| 0,063 | 0,498 | 0,589 |

O monómero M3, como podemos comprovar pelos gráficos em baixo (gráfico 4 e tabela 12), tem o seu valor de viabilidade celular mais elevado quando se encontra na concentração de 0,1 µM e o valor de viabilidade celular mais baixo quando se encontra na diluição de 1 mM, sendo que os resultados apresentados provam então que o monómero M3 é citotóxico, dependendo a sua citotoxicidade da quantidade de monómero existente na solução, confirmando assim a relação dose-dependente do monómero M3 para os níveis de viabilidade celular.

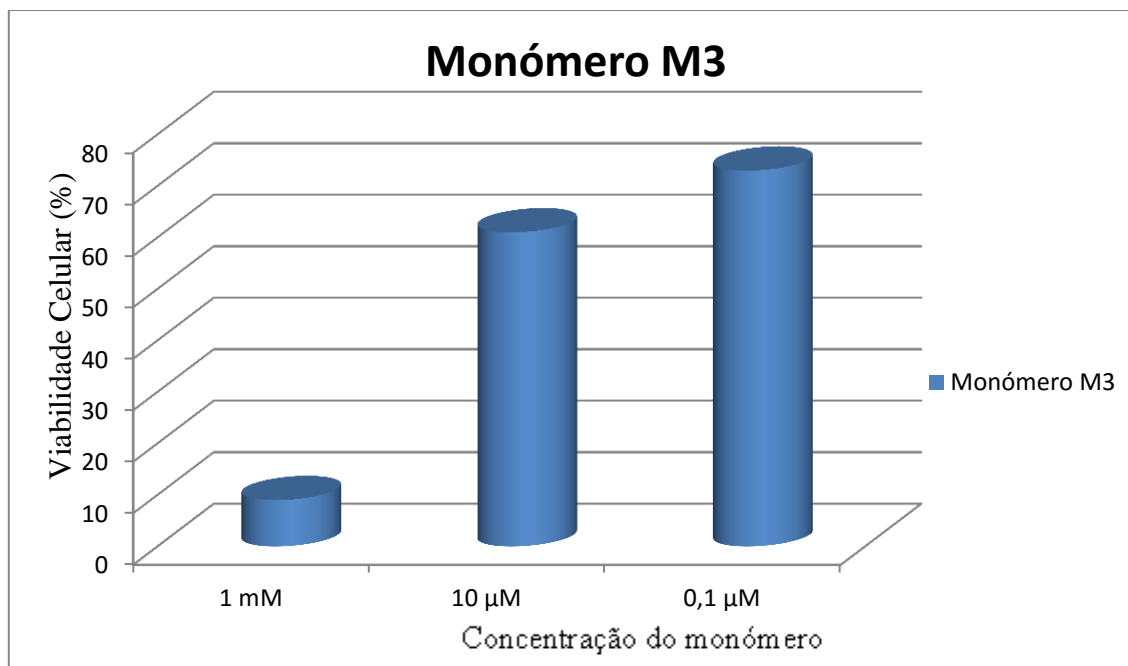


Gráfico 4. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições do monómero M3, resultante do teste do MTT.

Tabela 12. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições do monómero M3, resultante do teste do MTT e desvio-padrão.

A, b e c são os subgrupos homogêneos.

| Material Usado | Experiência efectuada | Concentração 1 mM | Concentração 10 µM | Concentração 0.1 µM | Valor Significância |
|----------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Monómero M3 | Teste do MTT | 8,96 ^a ±1,53 | 61,50 ^b ±6,64 | 73,03 ^c ±7,33 | <0.01 |

Analisando atentamente a tabela 4 (em baixo), podemos verificar se há ou não diferenças estatisticamente significativas para as mesmas concentrações de monómero, através dos resultados obtidos com o teste de Tamhane.

Tabela 13. Percentagem de viabilidade celular após contacto, durante 24h, com diferentes diluições dos monómeros M1,M2 e M3, resultante do teste do MTT e desvio padrão.

a,b e c são subgrupos homogêneos.

| Quantidade de Monómero | Estudo efectuado | M1 | M2 | M3 | Valor significância |
|------------------------|------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|
| 1mM | MTT | 57,55 ^a ±2,32 | 28,19 ^b ±7,00 | 8,96 ^c ±1,53 | <0,01 |
| 10 µM | MTT | 58,99 ^a ±5,38 | 58,69 ^a ±4,53 | 61,50 ^b ±6,64 | <0,01 |
| 0.1µM | MTT | 62,62 ^a ±11,59 | 53,53 ^a ±9,45 | 73,03 ^b ±7,33 | <0,01 |

Discussão

Ao longo desta investigação tentámos responder à hipótese experimental colocada no início deste trabalho, nomeadamente no ponto referente aos testes de citotoxicidade efetuados à linha celular 3T3 de fibroblastos de ratinho.

O que esta hipótese refere é que quando a linha celular 3T3 se encontra em contacto com os monómeros de metilmetacrilato, bisfenol-A glicidil metacrilato e dimetilmetacrilato de uretano, é expectável que estes produzam alterações da viabilidade celular.

O tipo de questão colocada é particularmente relevante quando falamos em biocompatibilidade de materiais dentários, uma vez que é importante minimizar os efeitos causados pela citotoxicidade dos mesmos, através do contacto direto com os tecidos orais (Schmalz & Bindsvlev, 2009).

Neste sentido, foi realizado um teste de citotoxicidade, o qual, dentro dos testes de biocompatibilidade *in vitro*, permite determinar a resposta biológica de culturas celulares quando expostas a materiais dentários (Jorge, Giampaolo, Machado & Verganil, 2004).

Compreende-se então que o estudo desses materiais seja fundamental, como no caso das resinas compostas, usadas como material de restauração provisório, em trabalhos de Prótese Fixa.

Por forma a mimetizar a situação do contacto entre as resinas (nomeadamente os seus monómeros) e os fibroblastos da gengiva, o protocolo foi realizado e aplicado em linhas celulares de fibroblastos 3T3 de ratinho.

Para este trabalho em concreto, foi seguido um protocolo já padronizado no laboratório de Biologia Molecular do ISCSEM, que permite um alto nível de reprodutibilidade, rapidez e eficácia e uma favorável relação custo/preço (Jorge et al., 2007).

No decorrer do trabalho, foram ainda aperfeiçoadas algumas técnicas, tendo sido consultados regularmente, para esse efeito, trabalhos já publicados neste domínio, por forma a otimizar todo o processo experimental e obter assim resultados fiáveis. Contudo, é importante referir que, tratando-se de um trabalho experimental realizado no âmbito universitário, não são de descartar eventuais discrepâncias nos valores associados aos resultados obtidos, já que é necessário ter em conta que o manuseamento de todos os materiais foi realizado por mão humana, aspeto que introduz eventualmente na pesquisa uma margem de erro.

É também importante referir que os controlos utilizados, nomeadamente os controlos que continham etanol (cuja viabilidade celular foi de 62,5%) e etanol/acetonitrilo (cuja viabilidade celular foi de 57,4%), mostraram que estes solventes induzem morte celular, não sendo por isso possível distinguir com clareza o efeito citotóxico do monómero M3 ou dos solventes utilizados.

Assim, como já foi referido anteriormente, testámos três monómeros descritos como constituintes de resinas compostas, e são eles: o metilmetacrilato (M1), bisfenol A glicidil metacrilato (M2) e dimetacrilato de uretano (M3).

As linhas celulares utilizadas para testar a citotoxicidade destes monómeros são consideradas como uma referência para este tipo de estudo, uma vez que está estudada e determinada a forma constante como se comportam ao longo do tempo, já para não falar do facto de serem facilmente amplificadas (Schmalz & Bindselev, 2009).

Portanto, o protocolo utilizado para a realização do ensaio experimental baseou-se no contacto das culturas celulares com agentes químicos citotóxicos, durante 24h, tendo sido utilizadas diferentes diluições para cada monómero (graças à adição de meio de cultura aos mesmos).

O teste do MTT é um ensaio *in vitro* que permite obter resultados que nos ajudam a responder às questões levantadas relativamente à citotoxicidade de cada um dos três monómeros.

O ensaio do MTT avalia a atividade das células, uma vez que, graças a desidrogenases metabólicas, produzem cristais intensamente coloridos de formazano, no interior das células. Estes, por sua vez podem ser dissolvidos por DMSO e permitir assim a realização de espectrofotometria, para que seja possível fazer a sua quantificação (Nicolau, Carvalho, Dias & Mota, 1999).

Para mensuração dessa reação de citotoxicidade causada pelos materiais, foi usado então o teste do MTT, que quantificou a viabilidade celular das células 3T3 de ratinho quando expostas aos monómeros das resinas compostas.

Este ensaio só é realizado após 24h de incubação da cultura de células com os compostos citotóxicos (Ishiyama, et al. 1996) e foi eleito para este trabalho para relacionar com trabalhos anteriores realizados no laboratório de Biologia Molecular do ISCSEM que mostraram a citotoxicidade das resinas compostas normalmente atribuída à presença de monómeros libertados.

Efetuiu-se, posteriormente, uma análise estatística com recurso ao programa SPSS, que nos permitisse verificar a taxa de viabilidade de cada cultura celular exposta às diferentes diluições dos monómeros. O que podemos concluir deste processo e dos resultados obtidos, é que, de facto, cada um dos monómeros, proveniente de cada uma das três resinas, é citotóxico. Dos três, o monómero mais citotóxico foi o dimetilmetacrilato de uretano, sendo o menos citotóxico, e por isso mais inofensivo para os fibroblastos, o metilmetacrilato.

Também podemos concluir que a taxa de viabilidade celular diminui conforme o aumento da concentração dos monómeros em contacto com as células 3T3 de ratinho.

Estes resultados evidenciam e permitem concluir que os monómeros proporcionam um efeito dose-dependente, já que uma diminuição gradativa da sua quantidade, em

contacto com a cultura de células, vai diminuindo o seu grau de citotoxicidade e gerando, conseqüentemente, menor morte celular.

Goldberg (2008) defende que as concentrações em que cada tóxico se encontra vão definir o nível de citotoxicidade do mesmo, ou seja, que existe uma relação dose-dependente, tal como verificámos também ao longo desta dissertação. É importante realçar, neste ponto, a redução do poder citotóxico do material que ocorre a nível da cavidade oral, pois este vai-se degradando progressivamente, o que tem por consequência a diminuição da sua concentração, assim como a diminuição do seu nível de citotoxicidade.

É também importante salientar que, aquando da avaliação da citotoxicidade das resinas compostas, apenas estavam em contacto com as células os monómeros purificados constituintes de cada uma, ou seja, o grau de citotoxicidade de cada um destes constituintes foi avaliado separadamente dos outros.

Este facto é bastante relevante tendo em conta que existem já alguns estudos publicados que se dirigem ao efeito que os monómeros isolados constituintes das resinas têm sobre as células (Geurtsen, Spahl & Leyhausen, 1998; Wataha et al., 1999; Bouillaguet et al., 2000; Geurtsen, 2000; Kleinsasser et al., 2004; Schweikl, Spagnuolo & Schmalz, (2006); Becher et et al., 2006; Goldberg, 2008; Chang et al. 2010; Kuan, Huang & Chan, 2012).

Segundo a norma ISO 10993-5 (2009), a citotoxicidade de materiais odontológicos é avaliada através do contacto direto, indireto ou através da utilização de extractos. Esta norma também afirma que a viabilidade celular de materiais classificados como não-citotóxicos deve ser superior a 75%, os ligeiramente citotóxicos, entre 50% a 70%, e os muito citotóxicos, quando a viabilidade é inferior a 25%.

Aplicando esta classificação aos resultados obtidos previamente neste ensaio experimental, e tendo em conta que os resultados observados foram resultantes do contacto entre os monómeros presentes nos extractos e as células 3T3, podemos então afirmar que o dimetacrilato de uretano, na sua diluição mais concentrada, é considerado muito tóxico, já que a taxa de viabilidade celular após o contacto com este químico é de 9%.

Já no caso dos monómeros de metilmetacrilato e bisfenol-A glicidil metacrilato, o lugar que ocupam na classificação, segundo a norma ISO, é o de ligeiramente citotóxicos, uma vez que as taxas de viabilidade celular após o contacto com estes monómeros é de 62%, para o metilmetacrilato, e de 28%, para o bisfenol-A.

Portanto, concluída a análise comparativa entre os resultados obtidos da viabilidade celular após o contacto com os três monómeros, é seguro afirmar que o mais citotóxico é o dimetacrilato de uretano, e os monómeros menos citotóxicos são o metilmetacrilato e o bisfenol-A glicidil metacrilato.

O dimetacrilato de uretano é, dependendo da sua concentração, capaz de provocar reações de citotoxicidade por parte das células, tornando-se assim muito citotóxico.

Os dados resultantes deste trabalho são fortalecidos por outros estudos, que obtiveram as mesmas conclusões que a presente dissertação, nomeadamente demonstram que o dimetacrilato de uretano e o metilmetacrilato são, de facto, citotóxicos (Gauthier, et al. 2007).

O metilmetacrilato, quando se encontra 99% puro quimicamente, tende a provocar mais reações citotóxicas (Labban, Song, Shibani & Windsor, 2008).

Também Goldberg (2008), afirma que os monómeros livres resultam da libertação que ocorre ao nível da conversão do monómero para polímero e, posteriormente, por substâncias lixiáveis resultantes da degradação do material ao longo do tempo.

Os monómeros residuais livres podem ser libertados da própria matriz da resina, podendo gerar, a nível das células pulpares, uma resposta em que as células entram em necrose e apoptose (Lee, Lim, Lee, Ahn & Yang, 2006).

No contacto resultante entre célula e os monómeros residuais livres, foram verificadas alterações celulares, nomeadamente na atividade enzimática, síntese macromolecular, ocorrendo também a perda da integridade da membrana celular, podendo esta ficar comprometida (Gautam et al. 2012).

À luz deste facto, é compreensível que células em contacto com material tóxico parem o seu crescimento celular, o que significa que a viabilidade celular se encontra assim comprometida (Gociu et al, 2013).

A necrose celular também se encontra relacionada com a diminuição da viabilidade celular. Segundo Gauthier et al (2007), através da análise microscópica, é possível observar nas células a necrose, derivada do contacto com a resina à base de dimetacrilato de uretano.

Também pode ocorrer os monómeros provocarem uma alteração da secreção das citocinas, podendo assim alterar a resposta inflamatória, ou seja, alterar uma das principais funções dos macrófagos, promovendo um ambiente desfavorável para uma cura bem sucedida, já que a normal função do macrófago se encontra alterada, devido ao contacto com os monómeros tóxicos (Metzger, 2000; Rakich, Wataha, Lefebvre & Weller, 1999).

É importante considerar, ainda, a questão estética, uma vez que essa tem sido uma preocupação crescente por parte dos doentes, que exigem cada vez mais uma melhor estética do processo restaurador por parte do médico dentista. Evidentemente, esta poderá ficar comprometida caso exista algum caso de gengivite ou recessão gengival provocados pelos materiais tóxicos utilizados.

Por exemplo, a nível da cavidade oral, geralmente em restaurações extensas, pode ocorrer o contacto das resinas com a gengiva, o que pode provocar gengivite localizada (Tadin et al., 2013; Kostoryz et al., 2001).

É também importante salientar, quanto ao protocolo experimental adotado com vista à aferição do nível de citotoxicidade de cada um dos monómeros constituintes das resinas compostas, que esta investigação não seguiu um protocolo na íntegra. Do aperfeiçoamento progressivo do trabalho e da aplicação criteriosa das suas técnicas, resultou, sobretudo, num aperfeiçoamento progressivo do protocolo na forma como este foi sendo gerido ao longo do tempo. À luz deste facto, é também importante ressaltar que os resultados obtidos não são por isso passíveis de ser comparados com outros resultados de outras investigações.

Extrapolar estes resultados para aquilo que aconteceria *in vivo* é algo que deve ser abordado futuramente, já que as culturas de células em contacto com o tóxico não

responderiam da mesma maneira, caso estivessem nos tecidos orais. Porém, a forma como um grupo específico de células responde a determinados tóxicos poderá ser investigada neste tipo de abordagem experimental, aplicada neste trabalho (Schmalz, 1994).

Devem ser realizados estudos adicionais, a nível de investigação, e por períodos mais longos de tempo. Dentro deste âmbito, devem ser realizados testes *in vivo* e testes quer em dentes hígidos, quer em dentes com lesões de cárie.

Desta maneira, espera-se obter mais resultados que possam servir de suporte ao uso clínico (ou seja, em meio clínico) destas resinas, já que estas têm sido usadas recorrentemente em prática clínica e são de grande importância em restaurações provisórias no domínio da reabilitação oral fixa.

Conclusão

Importa salientar, em primeiro lugar, a necessidade e o interesse de desenvolver e aprofundar futuramente o tema proposto e abordado neste estudo, a saber, os níveis de toxicidade de monómeros presentes nas resinas compostas utilizadas em coroas provisórias, no âmbito da reabilitação oral.

Considerando como provisórias ou preliminares as conclusões da presente investigação, e tendo em conta que esta representa, face ao conhecimento científico e técnico na área da medicina dentária e da saúde oral, e sendo uma análise parcelar dos efeitos dos materiais utilizados nesta área sobre os tecidos biológicos, conclui-se que existem reações de citotoxicidade na linha celular 3T3, quando exposta a resinas à base de metilmetacrilato, Bisfenol A glicidil metacrilato e dimetacrilato de uretano.

Com efeito, considera-se comprovado por este estudo que as reações citotóxicas variam conforme o monómero à qual as linhas celulares foram expostas, sendo que o grau de citotoxicidade varia desde o monómero menos tóxico ao monómero mais tóxico, a saber: MMA, Bis-GMA e UDMA.

Verificou-se que todos os monómeros causaram reação citotóxica nas células, sendo que uma das variáveis foi a concentração de tóxico dos monómeros UDMA e Bis-GMA, em que, quanto maior a quantidade de tóxico existente, maior o nível de citotoxicidade.

Considerando os resultados do presente estudo, estes remetem para a necessidade e o interesse de sensibilizar a classe médico-dentária para a toxicidade dos materiais que utilizam, uma vez que os dados obtidos têm apreciável valor indicativo quanto às implicações do uso de materiais dentários cujos componentes possam causar níveis relevantes de citotoxicidade. Estas conclusões preliminares incentivam novas investigações que, no futuro, permitam melhorar este tipo de materiais, nomeadamente no que diz respeito à sua biocompatibilidade com a saúde dos doentes.

Bibliografia

- Anusavice, J. (2003). *Phillips' science of dental materials*. Elsevier Health Sciences.
- Anusavice, K.J. (2012). Biocompatibility. In K.J. Anusavice, C. Shen, & H.R. Rawls, *Phillip's Science of Dental Materials* (12 ed., pp.111-147). Elsevier
- Becher, R., Kopperud, H. M., Al, R. H., Samuelsen, J. T., Morisbak, E., Dahlman, H. J., & Dahl, J. E. (2006). Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental Materials*, 22(7), 630-640.
- Bednarska, K., Rózga, B., Kołodziejczyk, K., Szosland, D., Leyko, W., & Bryszewska, M. (1998). Effect of low-power red light laser irradiation on the viability of human skin fibroblast. *Radiation and environmental biophysics*, 37(3), 215-217.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.
- Borenfreund, E., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of Two In Vitro Cytotoxicity Assays--The Neutral Red (Nr) and Tetrazolium MTT Tests. *Pergamon Journals Ltd*, 1-6.
- Bouillaguet, S., Wataha, J. C., Virgillito, M., Gonzalez, L., Rakich, D. R., & Meyer, J. M. (2000). Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) on THP-1 human monocyte-macrophages, in vitro. *Dental Materials*, 16(3), 213-217.
- Bowen, R. L., & Marjenhoff, W. A. (1992). Dental composites/glass ionomers: the materials. *Advances in dental research*, 6(1), 44-49.
- Bruzell, E. M., Morisbak, E., & Tønnesen, H. H. (2005). Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochemical & photobiological sciences*, 4(7), 523-530.
- Chang, M. C., Chen, L. I., Chan, C. P., Lee, J. J., Wang, T. M., Yang, T. T., & Jeng, J. H. (2010). The role of reactive oxygen species and hemoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*, 31(32), 8164-8171.

- Chaves, C. (2009). *Avaliação in vitro da citotoxicidade de monômeros, plastificante e produtos de degradação liberados a partir de resinas para reembasamento imediato*. Araraquara: [s.n.].
- Chaves, C.; Machado, A., Vergani, C., Souza, R., & Giampaolo, E. (2012). Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 14-127.
- Cimpan, M. R., Cressey, L. I., Skaug, N., Halstensen, A., Lie, S. A., Gjertsen, B. T., & Matre, R. (2000). Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *European journal of oral sciences*, 108(1), 59-69.
- Dahl, Jon E., Mary J. Frangou-Polyzois, & Gregory L. Polyzois. "In vitro biocompatibility of denture relining materials." *Gerodontology* 23.1 (2006): 17-22.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.
- Eick, J. D., Smith, R. E., Pinzino, C. S., Kotha, S. P., Kostoryz, E. L., & Chappelow, C. C. (2005). Photopolymerization of developmental monomers for dental cationically initiated matrix resins. *Dental Materials*, 21(4), 384-390.
- Feuerstein, T., Schauder, A., & Malik, Z. (2009). Silencing of ALA dehydratase affects ALA-photodynamic therapy efficacy in K562 erythroleukemic cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(10), 1461-1466.
- Gautam, R., Singh, R. D., Sharma, V. P., Siddhartha, R., Chand, P., & Kumar, R. (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100(5), 1444-1450.
- Gauthier, M. A., Simard, P., Zhang, Z., & Zhu, X. X. (2007). Bile acids as constituents for dental composites: in vitro cytotoxicity of (meth) acrylate and other ester derivatives of bile acids. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(17), 1145-1150.
- Geurtsen, W. (2000). Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 11.3, 333-355.
- Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W. , & Leyhausen, G. (1998). Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J. Biomed. Mater. Res.*, 41, 474-480.

- Gociu, M., Pătroi, D., Prejmerean, C., Păstrăv, O., Boboia, S., Prodan, D., & Moldovan, M. (2013). Biology and cytotoxicity of dental materials: an in vitro study. *Rom J Morphol Embryol*, 54(2), 261-265.
- Goldberg, M. (2008). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clinical oral investigations*, 12(1), 1-8.
- Gregson, K. S., O'Neill, J. T., Platt, J. A., & Windsor, L. J. (2008). In vitro induction of hydrolytic activity in human gingival and pulp fibroblasts by triethylene glycol dimethacrylate and monocyte chemotactic protein-1. *Dental materials*, 24(11), 1461-1467.
- Honoré, S., Kovacic, H., Pichard, V., Briand, C., & Rognoni, J. B. (2003). $\alpha 2\beta 1$ -integrin signaling by itself controls G1/S transition in a human adenocarcinoma cell line (Caco-2): implication of NADPH oxidase-dependent production of ROS. *Experimental cell research*, 285(1), 59-71.
- Huet, O., Petit, J. M., Ratinaud, M. H., & Julien, R. (1992). NADH-dependent dehydrogenase activity estimation by flow cytometric analysis of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Cytometry*, 13(5), 532-539.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-5: 2009. (2009). Biological evaluation of medical devices – Tests for in vitro cytotoxicity.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. (1996). A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19, n° 11, 1518-1520.
- Jorge, J., Giampaolo, E., Vergani, C., Machado, A., Pavarina, A., & Carlos, I. (2006). Effect of Post-Polymerization Heat Treatments on the Cytotoxicity of Two Base Acrylic Resins/ Efeito de Tratamentos Térmicos após a Polimerização sobre a Citotoxicidade de Duas Resinas Acrílicas para Base de Próteses. *J Appl Oral Sci*, 14 (3), 203-207.
- Jorge, J., Giampaolo, E., Vergani, C., Machado, A., Pavarina, A., & Carlos, I. (2007). Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and postpolymerisation treatments. *Gerodontology* 24, 52–57.
- Jorge, J. H., Giampaolo, E.T., Machado, A. L., Vergani, C. E. (2004). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, pp. 190-193.
- Kedjarune, U., Charoenworraluk, N., & Koontongkaew, S. (1999). Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian dental journal*, 44(1), 25-30.

- Kleinsasser, N. H., Wallner, B. C., Harréus, U. A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2004). Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *Journal of dentistry*, 32(3), 229-234.
- Kostoryz, E. L., Tong, P. Y., Strautman, A. F., Glaros, A. G., Eick, J. D., & Yourtee, D. M. (2001). Effects of dental resins on TNF- α -induced ICAM-1 expression in endothelial cells. *Journal of dental research*, 80(9), 1789-1792.
- Kuan, Y. H., Huang, F. M., Li, Y. C., & Chang, Y. C. (2012). Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF κ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4003-4009.
- Labban, N., Song, F., Al-Shibani, N., & Windsor, L. J. (2008). Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/growth factor expression. *The Journal of prosthetic dentistry*, 100(5), 390-397.
- Lee, D. H., Lim, B. S., Lee, Y. K., Ahn, S. J., & Yang, H. C. (2006). Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dental materials*, 22(12), 1086-1092.
- Lefebvre, C., & Schuster, G. (1994). Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *The Journal of prosthetic dentistry*, 71.2, 178-185.
- Lefebvre, C. A., Schuster, G. S., Caughman, G. B., & Caughman, W. F. (1990). Effects of denture base resins on oral epithelial cells. *The International journal of prosthodontics*, 4(4), 371-376
- Longo, D. (2013). *Avaliação da citotoxicidade e expressão de citocinas induzidas por resina composta fotopolimerizável*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Brazil.
- Meerlo, J. van, Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture*. Humana Press, 237-245.
- Metzger, Z. (2000). Macrophages in periapical lesions. *Dental Traumatology*, 16(1), 1-8.
- Mitchell, R. J., Koike, M., & Okabe, T. (2007). Posterior amalgam restorations—usage, regulation, and longevity. *Dental Clinics of North America*, 51(3), 573-589.
- Moharamzadeh, K., Van Noort, R., Brook, I. M., & Scutt, A. M. (2007). Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental materials*, 23(1), 40-44.

- Morgan, D. (1998). Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Polyamine protocols*. Humana Press, 179-184.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65.1, 55-63.
- Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A., & Chen, P. (2013). Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release* 166, 182–194.
- Nakamura, M., & Kawahara, H. (1984). Long-term biocompatibility test of denture base resins in vitro. *The Journal of prosthetic dentistry*, 52(5), 694-699.
- Naoum, S. J., Ellakwa, A., Morgan, L., White, K., Martin, F. E., & Lee, I. B. (2012). Polymerization profile analysis of resin composite dental restorative materials in real time. *Journal of dentistry*, 40(1), 64-70.
- Nicolau, A., Dias, N., Carvalho, G. S. D., Mota, M., & Lima, N. (1999). *Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: ensaios in vitro*. Repositorium.sdum.uminho.pt.
- Nikkhah, G., Tonn, J. C., Hoffmann, O., Kraemer, H. P., Darling, J. L., Schachenmayr, W., & Schönmayr, R. (1992). The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. *Journal of neuro-oncology*, 13(1), 13-24.
- Orimoto, A., Suzuki, T., Ueno, A., Kawai, T., Nakamura, H., & Kanamori, T. (2013). Effect of 2-Hydroxyethyl Methacrylate on Antioxidant Responsive Element-Mediated Transcription: A Possible Indication of Its Cytotoxicity. *PloS one*, 8(3).
- Pătroi, D., Gociu, M., Prejmerean, C., Colceriu, L., Dumitrescu, L., Moldovan, M., & Naicu, V. (2013). Assessing the biocompatibility of a dental composite product. Faculty of Dental Medicine. *R J M E Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 54(2), 321–326.
- Peutzfeldt, A. (1997). Resin composites in dentistry: the monomer systems. *European journal of oral sciences*, 105(2), 97-116.
- Rakich, D. R., Wataha, J. C., Lefebvre, C. A., & Weller, R. N. (1999). Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *Journal of endodontics*, 25(2), 114-117.
- Rawls H. R., & Esquivel-Upshaw J. (2005) Resinas Restauradoras. *Anusavice KJ Phillips – materiais dentários*. Elsevier; 375-417.

- Reichl, F. X., Seiss, M., Kleinsasser, N., Kehe, K., Kunzelmann, K. H., Thomas, P., & Hickel, R. (2008). Distribution and excretion of BisGMA in guinea pigs. *Journal of dental research*, 87(4), 378-380.
- Rodrigues, S. A., Scherrer, S. S., Ferracane, J. L., & Della B. A. (2008). Microstructural characterization and fracture behavior of a microhybrid and a nanofill composite. *Dental Materials*, 24(9), 1281-1288.
- Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22, S6-S11.
- Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D. (2009). *Biocompatibility of dental materials*. Berlin, Germany: Springer, 99-138.
- Schweikl, H., Spagnuolo, G., & Schmalz, G. (2006). Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *Journal of dental research*, 85(10), 870-877.
- Selimović-Dragaš, M., Huseinbegović, A., & Hatibović-Kofman, Š. (2012). A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. *Bosnian journal of basic medical sciences/ Association of Basic Medical Sciences 12.4*, 273-278.
- Solderholm, K. J., & Mariotti, A. (1999). BIS-GMA-based resins in dentistry: are they safe? *The Journal of the American Dental Association*, 130(2), 201-209.
- Sofou, A., Tsoupi, I., Emmanouil, J., & Karayannis, M. (2005). HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381(7), 1336-1346.
- Songa, H., Kima, M., Parka, E., Songa, H., Anusavice, K., & Parka, Y. (2014). Cytotoxicity of alloying elements and experimental titanium alloys by WST-1 and agar overlay tests. *Dental materials* 30, 977–983.
- Stockert, J., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R., & Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica 114*, 785– 796.
- Tadin, A., Galic, N., Mladinic, M., Marovic, D., Kovacic, I., & Zeljezic, D. (2014). Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clinical oral investigations*, 18(1), 87-96.
- Todaro, G., & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Culture* 313, 201, 299-313.

- Urcan, E., Scherthan, H., Styllou, M., Haertel, U., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2010). Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials*, 31(8).
- Vallittu, P., Ruyter, I., & Sebnem, B. (1998). Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *European journal of oral sciences* 106.1, 588-593.
- Van de Sandt, J. J. M., Rutten, A. A. J. J. L., & Koëter, H. B. W. M. (1993). Cutaneous toxicity testing in organ culture: neutral red uptake and reduction of tetrazolium salt (MTT). *Toxicology in vitro*, 7(1), 81-86.
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research*, 51(10), 2515-2520.
- Wataha, J. C., Rueggeberg, F. A., Lapp, C. A., Lewis, J. B., Lockwood, P. E., Ergle, J. W., & Mettenberg, D. J. (1999). In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clinical oral investigations*, 3(3), 144-149.
- Wennberg, A. (1988). *In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials—the millipore filter method*. *International Endodontic Journal*, 21, 67–71.
- Yoshii, E. (1997). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *Journal of biomedical materials research*, 37(4), 517-524.