



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ADESIVOS EM
CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE RATO (LINHA CELULAR
3T3/SIGMA)**

Trabalho submetido por
Sofia Oliveira dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ADESIVOS EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE RATO (LINHA CELULAR 3T3/SIGMA)

Trabalho submetido por
Sofia Oliveira Dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Paulo Maurício

e coorientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

outubro de 2020

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe
quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

- Fernando Pessoa

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos o que tornaram possível o final desta fantástica etapa.

Ao meu orientador Prof. Doutor Paulo Maurício, pela confiança que depositou em mim.

À minha coorientadora Prof.^a Doutora Isabel Barahona por todas as horas que passou comigo no laboratório, por todo o apoio dado durante a realização deste trabalho e ensinamentos partilhados.

À Prof.^a Doutora Madalena Oom por toda ajuda que disponibilizou durante esta investigação.

Ao Prof. Paulo Mascarenhas por toda a sua colaboração.

Aos meus pais, porque sem eles nada disto seria possível, vocês são incríveis.

Ao meu namorado e melhor amigo, Andrés Maglioni, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio incondicional e paciência durante quase quatro anos de curso, pelos choros, pelos sorrisos, pelos incentivos e consolos. Esta é para os dois!

À minha colega e amiga Sofia Coroado pelas conversas e momentos partilhados, parabéns conseguimos!

Às minhas colegas de box Carlota Simões e Carolina Tavares que aguentaram o barco por mim em todas as vezes que tive que sair para ir cuidar das minhas células. Parabéns conseguimos!

À minha colega de box Carolina Branca que foi a minha primeira parceira, que esteve comigo na minha primeira consulta e no meu primeiro sorriso com um paciente. Parabéns conseguimos!

A todos os meus amigos que me acompanharam neste percurso.

A todos, o meu mais sincero Obrigada!

RESUMO

Objetivo: Avaliar o potencial citotóxico de dois tipos de adesivos no mercado: Scotchbond Universal e Optibond Solo Plus, e um adesivo em fase experimental: T1, quando em contacto com fibroblastos de rato da linha celular 3T3 e em osteoblastos humanos da linha celular MG63.

Métodos: Uma quantidade definida de células foi colocada em placas de 96 poços. Os adesivos foram pincelados em caixas de *petri* e polimerizados de acordo com as indicações do fabricante. Seguidamente foram imersos em meio de cultura e incubados por 24 horas. As células foram expostas a diferentes diluições dos extratos, filtrados e não filtrados para os fibroblastos 3T3, e apenas não filtrados para os osteoblastos MG63. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método de MTT. A análise estatística foi feita no programa SPSS, por meio de análise de variância (ANOVA) e testes de multicomparação de Tukey HSD. O nível de significância foi estabelecido a $p < 0,05$.

Resultados: Para os fibroblastos 3T3 a ordem de citotoxicidade dos extratos dos adesivos, não filtrados foi $T1 < \text{Optibond Solo Plus} < \text{Scotchbond Universal}$, revelando alterações quando filtrados: $T1 < \text{Scotchbond Universal} < \text{Optibond Solo Plus}$; Para os osteoblastos MG63 o mais tóxico foi o Scotchbond Universal e o menos tóxico o T1.

Conclusões: Apesar das limitações deste estudo *in vitro*, podemos concluir que os três adesivos apresentam um efeito dose-dependente, maior concentração de extrato, maior o seu poder citotóxico. A filtração de um mesmo extrato, ou a sua ausência, tem efeitos na viabilidade celular, assim como a alteração do tipo de célula, sendo as MG63 mais sensíveis. Apesar dos resultados promissores do adesivo T1, são necessários mais testes que corroborem com este estudo e avaliem outros parâmetros relativos à sua eficácia enquanto adesivo.

Palavras-Chave: Sistemas Adesivos; Citotoxicidade; Ensaio de MTT; Viabilidade Celular.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the cytotoxic potential of two types of adhesives on the market: Scotchbond Universal and Optibond Solo Plus, and an adhesive in experimental phase: T1, when in contact with mouse fibroblasts of the 3T3 cell line and in human osteoblasts of the MG63 cell line.

Methods: A defined number of cells was placed in 96 well plates. The adhesives were brushed in petri dishes and polymerized according to the manufacturer's indications. Then they were immersed in culture medium and incubated for 24 hours. The cells were exposed to different dilutions of extracts, filtered and unfiltered for 3T3 fibroblasts, and only unfiltered for MG63 osteoblasts. Cell viability was evaluated using the MTT method. Statistical analysis was performed in the SPSS program, through analysis of variance (ANOVA) and Tukey HSD multicomparison tests. The significance level was established at $p < 0.05$.

Results: For 3T3 fibroblasts the cytotoxicity order of the unfiltered adhesive extracts was $T1 < \text{Optibond Solo Plus} < \text{Scotchbond Universal}$, revealing changes when filtered: $T1 < \text{Scotchbond Universal} < \text{Optibond Solo Plus}$; For MG63 osteoblasts the most toxic was Scotchbond Universal and the least toxic was T1.

Conclusions: Despite the limitations of this *in vitro* study, we can conclude that the three adhesives present a dose-dependent effect, higher concentration of extract, higher cytotoxic power. The filtration of the same extract, or its absence, has effects on cell viability, as well as the alteration of the type of cell, being MG63 more sensitive. Despite the promising results of T1 adhesive, more tests are needed to corroborate this study and evaluate other parameters related to its effectiveness as an adhesive.

Keywords: Adhesive Systems; Cytotoxicity; MTT Assay; Cell Viability.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE GERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	11
LISTA DE SIGLAS.....	13
I. INTRODUÇÃO	15
1. Substratos dentários	18
1.1. Esmalte	19
1.2. Dentina.....	20
1.3. Polpa Dentária	22
2. Adesão	24
2.1. Adesão ao Esmalte:	26
2.2. Adesão à dentina:.....	27
2.3.1. Adesivos Etch and Rinse	30
2.3.2. Adesivos Self-Etch	30
3. Biocompatibilidade.....	33
3.1. Estudos in vitro	36
3.1.1. Teste de Redução do MTT	37
4. OBJETIVO	39
5. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	39
II. MATERIAIS E MÉTODOS	41
1.1. Adesivos	41
1.2. Linha Celular	42

1.2.1. Células 3T3.....	42
1.2.2. Células MG63.....	42
1.3. Reagentes.....	43
2. MÉTODOS.....	45
2.1. Preparação da Cultura de Células:.....	45
2.1.1. Subculturas	47
2.1.2. Contagem de Células em Suspensão	48
2.3. Preparação dos Tóxicos (Extratos dos Adesivos):	50
2.4. Ensaio do MTT	51
A. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:.....	55
B. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos com filtração:.....	56
C. Ensaio de MTT com células MG63 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:.....	57
2.5. Determinação da viabilidade celular:	58
2.6. Análise Estatística.....	59
III. RESULTADOS	61
A. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:.....	61
B. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos com filtração:.....	63
C. Comparação dos resultados dos extratos não filtrados com os extratos filtrados, dos diferentes adesivos.	65
D. Ensaio de MTT com células MG63 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:.....	67
E. Comparação dos resultados dos extratos não filtrados entre células 3T3 e células MG63.....	69

F. Resultados dos LD50 para os extratos dos adesivos em contacto com as células 3T3 72

IV. DISCUSSÃO	77
V. CONCLUSÕES.....	83
VI. BIBLIOGRAFIA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte sagital de molar inferior. Esquema ilustrativo da anatomia dentária...	18
Figura 2. Esquema exemplificativo da adesão à dentina.....	28
Figura 3. Classificação dos sistemas adesivos.	32
Figura 4. Adesivos utilizados neste estudo.....	41
Figura 5. Células 3T3 não confluentes (MOI contraste de fase 200x).....	46
Figura 6. Células 3T3 confluentes (MOI contraste de fase 200x).....	46
Figura 7. Presença de <i>pellet</i> após centrifugação.....	47
Figura 8. Células destacadas após tripsinização.....	47
Figura 9. Câmara de <i>Neubauer</i> com lamela e solução para contagem de células.....	48
Figura 10. Observação das células nos quadrados de contagem da câmara de <i>Neubauer</i> (MOI ampliação 100x).	49
Figura 11. Conversão do MTT em Formazan.	49
Figura 12. Preparação da amostra do adesivo T1 após polimerização.....	50
Figura 13. Placa de 96 poços preenchida com células e meio completo.....	51
Figura 14. Placa de 96 poços após 3 horas de incubação com o MTT, com formação de precipitados azuis- violeta.	52
Figura 15. <i>Orbital-Shaker</i> (PSU-20i Grant-bio)	52
Figura 16. Imagem exemplificativa da coloração das diferentes colunas após ensaio de MTT.....	53
Figura 17. Leitor de placas (Platos R 496, Diagnostics)	53
Figura 18. Esquema ilustrativo da sequência de procedimentos num ensaio de MTT.	54
Figura 19. Preparação dos extratos dos adesivos em placas de petri, para as células 3T3.	55
Figura 20. Partículas em suspensão no preparo dos extratos dos adesivos.	56
Figura 21. Preparação dos extratos dos adesivos, em placas de petri, para as células MG63.....	57
Figura 22. Gráfico representativo dos resultados do ensaio de MTT em células 3T3. Avaliação da viabilidade celular nas diferentes diluições dos adesivos sem filtração... ..	62
Figura 23. Gráfico representativo dos resultados do ensaio de MTT em células 3T3. Avaliação da viabilidade celular nas diferentes diluições dos adesivos com filtração. .	64
Figura 24. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 obtidos para o adesivo T1 após exposição a extratos não filtrados e filtrados.....	65

Figura 25. Comparação dos valores de viabilidade celular das células 3T3 obtidos para o adesivo Optibond após exposição a extratos não filtrados e filtrados.	65
Figura 26. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 obtidos para o adesivo Scotchbond após exposição a extratos não filtrados e filtrados.	66
Figura 27. Gráfico representativo dos resultados do ensaio de MTT em células MG63. Avaliação da viabilidade celular nas diferentes diluições dos adesivos com filtração. .	68
Figura 28. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 e MG63, quando expostas aos extratos não filtrados do adesivo T1.....	70
Figura 29. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 e MG63, quando expostas aos extratos não filtrados do adesivo Optibond Solo Plus.....	70
Figura 30. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 e MG63, quando expostas aos extratos não filtrados do adesivo Scotchbond Universal.....	71
Figura 31. LD50 do adesivo T1 em contacto com células 3T3.....	72
Figura 32. LD50 do adesivo Optibond Solo Plus em contacto com células 3T3.....	73
Figura 33. LD50 do adesivo Scotchbond Universal em contacto com células 3T3.....	73
Figura 34. LD50 do adesivo T1 em contacto com as células MG63.	74
Figura 35. LD50 do adesivo Optibond Solo Plus em contacto com as células MG63..	75
Figura 36. LD50 do adesivo Scotchbond Universal em contacto com as células MG63.	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Adesivos utilizados na pesquisa.	41
Tabela 2. Reagentes utilizados na pesquisa.	43
Tabela 3. Composição do meio completo DMEM (células 3T3).	43
Tabela 4. Composição do meio completo EMEM (células MG63).	44
Tabela 5. Equipamentos usados no estudo.	44
Tabela 6. Material descartável utilizado neste estudo.	45
Tabela 7. Descrição dos grupos usados na presente investigação.	51
Tabela 8. Diluições dos extratos usadas nos ensaios de MTT.	55
Tabela 9. Diluições dos extratos usadas nos ensaios de MTT.	57
Tabela 10. Valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células 3T3 expostas a extratos não filtrados (placa 1).	61
Tabela 11. Continuação dos valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células 3T3 expostas a extratos não filtrados (placa 2).	61
Tabela 12. Valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células 3T3 expostas a extratos filtrados.	63
Tabela 13. Resultados para o teste de Tukey HSD que relacionam a viabilidade celular com a filtração, ou não filtração, dos extratos.	67
Tabela 14. Valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células MG633 expostas a extratos não filtrados.	67
Tabela 15. Continuação dos valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células MG633 expostas a extratos não filtrados (placa 2).	68
Tabela 16. Resultados para o teste de Turkey HSD que relacionam a viabilidade celular com o tipo de célula usada no ensaio (3T3 ou MG63).	71

LISTA DE SIGLAS

4-META – 4-metacriloxi-etil-trimetilato-anidrido

ANOVA – Análise de variância, do inglês *Analysis of Variance*

ATCC – *The Global Bioresource Center*.

BIS-GMA – Bisfenol A-Glicidil metacrilato

CQ – Canforoquinona

DMEM – Meio de Eagle modificado por *Dulbecco*, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EMEM – Meio essencial mínimo de *Eagle*, do inglês *Minimum Essential Medium Eagle*

GSH – Glutathiona

HEMA – 2-hidroxietil metacrilato

ISO – Organização Internacional de Normalização, do inglês *International Organization for Standardization*

LD50 – Dose letal mediana, do inglês *lethal dose*

LED – Diodo emissor de luz, do inglês *light-emitting diode*

MOI – Microscópio ótico invertido

MTT – Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NEM – Solução de amino ácidos não essenciais, do inglês *Non-Essential Amino Acids solution*

OP – Optibond Solo Plus

PBS – Tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PNA – Piruvato de sódio

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

SC - Scotchbond Universal

SDH – Succinato desidrogenase, do inglês *succinate desidrogenase mitochondrial*

SE – *Self-Etch*

SPSS – Pacote estatístico para as ciências sociais, do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*

TEGMA – Trietileno glicol dimetacrilato, do inglês *Triethylene glycol dimethacrylate*

UDMA – Uretano dimetacrilato, do inglês *Urethane dimethacrylate*

I. INTRODUÇÃO

A Medicina Dentária, com especial foco para a prática da dentisteria operatória, sofreu uma grande remodelação nos últimos anos. Esta deu-se graças à crescente procura por estética e restaurações que conservassem cada vez mais tecido dentário sã (Van Meerbeek et al., 2011).

A procura levou ao desenvolvimento do conceito de adesão aos tecidos dentários. Este avanço permitiu aprimorar a forma como se faziam os preparos cavitários. Até então, o preparo dos dentes era feito de acordo com o proposto por Black, refletindo formas padronizadas e de dimensões, por vezes, desnecessariamente grandes (Alex, 2015).

Assim, em simbiose com esta nova noção surgiu a doutrina da dentisteria minimamente invasiva. Esta defende procedimentos restauradores muito mais conservadores, uma vez que preconiza uma remoção de tecido dentário limitada apenas à extensão da lesão de cárie (Alex, 2015).

Aliado a este novo conceito apareceram também novos materiais, com propriedades intrínsecas vantajosas e aptos a responder a esta nova demanda, nomeadamente os compósitos resinosos capazes de aderir aos substratos dentários, através do uso de um sistema adesivo. Estes vieram substituir, na sua grande maioria, os procedimentos que até à data eram feitos com amálgama (Liu et al, 2013c; Spencer, Ye, Misra, Goncalves & Laurence, 2014).

Este conceito de adesão, teve início em 1955, tendo sido Buonocore o responsável por introduzir a técnica de condicionamento ácido ao esmalte, que é largamente utilizada nos dias de hoje. Esta resultou da aplicação prévia de um ácido fosfórico a 85% durante 30 segundos sobre a superfície de esmalte. Desta forma, concluiu-se que era possível aumentar significativamente a adesão dos materiais resinosos. Consequentemente tornou-se possível obter uma expressiva melhoria no selamento marginal de restaurações localizadas sobre esmalte (Alex, 2015).

O princípio fundamental da adesão à estrutura dentária é um processo de duas fases, que leva à troca de minerais por monómeros resinosos. A primeira fase envolve a remoção do cálcio e a criação de porosidades, quer em esmalte quer em dentina. A segunda fase, que

é denominada por hibridação, consiste na penetração e polimerização dos monómeros no interior das porosidades geradas anteriormente (Van Meerbeek et al., 2003).

Embora este processo mecânico represente um pré-requisito para a obtenção de uma adesão adequada, sabe-se atualmente, que uma adesão química adicional, entre os monómeros resinosos funcionais, melhora de sobremaneira a durabilidade adesiva (Tadin, Gavić & Galić, 2016; Marovic, Tadin, Mladinic, Juric-Kacunic & Galic, 2014).

Concomitante com estes aspetos e com vista a alcançar o maior sucesso clínico possível estão constantemente a ser desenvolvidos novos adesivos com propriedades químicas mais elaboradas e complexas (Van Landuyt et. al., 2007; Marovic et. al., 2014).

Assim, uma vez que a restauração é utilizada para substituir tecidos dentários danificados ou defeituosos, todos os materiais usados neste processo deveriam ser quimicamente estáveis e inertes para a cavidade oral. Porém, estudos anteriores relatam que os materiais dentários, nomeadamente os adesivos, demonstram algum grau de dissolução ou degradação ao longo do tempo. Este facto deve-se, não apenas à sua composição, mas também, a outras variáveis como, a condição e composição do substrato, a técnica clínica, o tamanho e forma da cavidade e a qualidade da polimerização (Tadin et al., 2016).

Os monómeros resinosos, como TEGDMA, HEMA, BIS-GMA, UDMA, tradicionalmente presentes na composição dos sistemas adesivos, têm sido apontados como uns dos grandes responsáveis por esta citotoxicidade. Estes monómeros, assim como outros componentes dos adesivos, podem pôr em causa funções celulares básicas (Bianchi et al., 2013).

Deste modo, pela apetência de certos compostos para serem tóxicos, devido à libertação inerente de alguns componentes, e uma vez que estes materiais se encontram em extenso e direto contacto com os substratos dentários, durante um longo período de tempo, a determinação do seu grau de biocompatibilidade é de primordial importância (Tadin et al., 2016; Shahi et al., 2019).

A busca por materiais cada vez mais biocompatíveis, determina a realização de testes laboratoriais que demonstrem a não toxicidade de um novo material desenvolvido.

Os principais meios de ensaios de biocompatibilidade são os testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos, que permitem garantir a segurança de um qualquer material antes de poder ser

amplamente utilizado (Koulaouzidou, Helvatjoglu-Antoniades, Palaghias, Karanika-Kouma & Antoniades, 2009; Jiang et al., 2017).

Devido ao grau de padronização e reprodutividade dos testes de citotoxicidade feitos em culturas de células, determinou-se que os ensaios *in vitro* deveriam ser o primeiro passo para classificar a biocompatibilidade de um novo sistema, uma vez que constituem uma forma sensível, barata, reprodutível e bastante conveniente (Silva et al., 2014).

1. Substratos dentários

De modo a perceber como um agente tóxico pode atuar quando em contacto com a estrutura dentária é importante entender a composição dos diferentes substratos.

Os dentes são compostos por três tecidos mineralizados, o esmalte, a dentina e o cimento, que se encontram em torno de um núcleo interno, de tecido conjuntivo frouxo, a polpa dentária (figura 1) (Berkovitz, Holland & Moxham, 2017).

Quanto à origem destes tecidos, o esmalte é de origem ectodérmica, enquanto que a dentina, cimento e polpa dentária são de origem ectomesenquimatosa (Ritter, Boushell & Walter, 2017).

A dentina forma a maior parte do dente e é coberta, na coroa, com esmalte e, na raiz, com cimento. A polpa dentária deriva da papila dentária e os odontoblastos presentes são responsáveis pela produção contínua de dentina ao longo da vida. Os odontoblastos também funcionam como células sensoriais, uma vez que têm a capacidade de detetar estímulos e toxinas que possam afetá-la (Berkovitz et al., 2017).

Os tecidos que suportam os dentes, conhecidos coletivamente como periodonto, incluem o osso alveolar, o ligamento periodontal (um tipo de tecido conjuntivo que liga o dente ao osso alveolar) e a gengiva (o componente da mucosa oral que se encontra em torno do dente) (Bath-Balog & Fehrenbach, 2012).

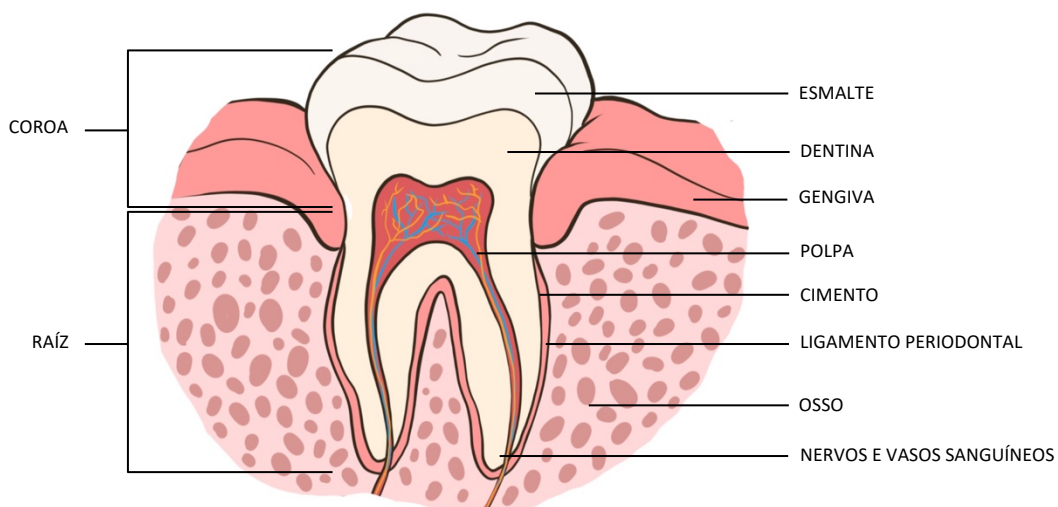


Figura 1. Corte sagital de molar inferior. Esquema ilustrativo da anatomia dentária.

1.1. Esmalte

O esmalte dentário é a substância mais dura do corpo humano e serve como camada exterior resistente ao desgaste da coroa dentária. Forma uma barreira isoladora que protege o dente de forças físicas, térmicas e químicas potencialmente prejudiciais ao tecido vital da polpa (Lacruz, Habelitz, Wright & Paine, 2017).

No que concerne às propriedades físicas do esmalte, além da elevada dureza supracitada, este também possui um elevado módulo de elasticidade e uma alta resistência ao desgaste, estes aspetos conferem-lhe uma grande estabilidade a longo prazo, o que impõe a sua relevância, visto que o esmalte não tem a capacidade de sofrer substituição ou reparação (Berkovitz et al., 2017).

A amelogenese, é o processo de formação do esmalte e é efetuado por células denominadas ameloblastos (Ritter et al., 2017).

Quimicamente, o esmalte é uma estrutura cristalina altamente mineralizada, contendo 92-96% de componentes inorgânicos, dos quais 90-92% são fosfato de cálcio sob a forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o restante são outros minerais e vestígios de distintos elementos, porém em menores quantidades. Este conteúdo mineral aumenta da junção amelodentinária para a superfície (Qamar, Rahim, Chew & Fatima, 2017).

Como constituintes remanescentes consideram-se as proteínas, que ocupam 1-2% em volume, e a água, que corresponde a 4-12% em volume, quanto mais água maior porosidade tem o tecido (Ritter et al., 2017; Berkovitz et al., 2017).

Em oposição à dentina e ao tecido ósseo, o esmalte não apresenta colagénio na sua composição e é totalmente desprovido de células, vascularização e inervação (Azevedo, Faber, Leal & Lucci, 2016).

Este substrato tem distintas propriedades consoante as diferentes regiões do tecido. A superfície do esmalte difere, tanto física quanto quimicamente, do esmalte subsuperficial. Superficialmente é mais duro, mais denso e menos poroso que subsuperficialmente (Berkovitz et al., 2017).

O conhecimento da composição e morfologia do esmalte, tem permitido que se entenda melhor a iniciação e o progresso das cáries. Assim é possível alcançar uma abordagem

muito mais conservadora utilizando o fenómeno da remineralização e reduzindo a necessidade de remoção de tecido hígido.

1.2. Dentina

A dentina é o tecido mineralizado que forma a maior parte do dente. É rígida, porém elástica, e é constituída por uma grande quantidade de pequenos túbulos paralelos numa matriz de colagénio mineralizada (Berkovitz et al., 2017).

Ao contrário do esmalte, apesar deste tecido também carecer de vascularização e de inervação, a dentina é um tecido vital e dinâmico. Esta propriedade dá-se graças à presença de prolongamentos odontoblásticos nos túbulos dentinários, que permitem a comunicação direta entre a dentina e a polpa, resultando numa capacidade resposta perante estímulos externos, podendo estes, ser térmicos, mecânicos ou químicos (Carvalho, Manso, Geraldeli, Tay & Pashley, 2012; Fruits, Khajotia, & Nicholson, 2013).

Para além da sensibilidade, característica bastante pertinente da dentina, este tecido também apresenta uma outra propriedade intrínseca de grande relevância, nomeadamente a aptidão para se regenerar e formar durante toda a vida. O aumento de espessura de dentina resulta da atividade dos odontoblastos presentes na polpa dentária, que por sua vez vai diminuindo ao longo do tempo (Berkovitz et al., 2017).

Quanto à sua composição, este tecido é formado por cerca de 50% de matéria inorgânica ou mineralizada, 30% de matéria orgânica e 20%, de água por volume (Bath-Balog & Fehrenbach, 2012).

O componente mineral inorgânico apresenta-se na forma de cristais de hidroxiapatita de cálcio, semelhantes àqueles encontrados em altos percentuais no esmalte, mas assumem o formato de placas e são menores. Também podem ser encontradas pequenas concentrações de outros minerais, como carbono e flúor (Bath-Balog & Fehrenbach, 2012).

Em relação à matriz orgânica, verifica-se que o colagénio é um constituinte essencial, sendo que ocupa de 90% desta, e é nele que se encontram impregnados os cristais de

hidroxiapatite, sendo a restante matriz constituída por outras proteínas e lípidos (Nanci, 2013).

A permeabilidade do tecido dentinário, está dependente do tamanho e da frequência dos túbulos, que decrescem com a idade. Estimativas sobre o número de túbulos sugerem que existam cerca de 20.000/mm² na dentina mais externa, 50.000/mm² na mais interna e 40.000/mm² no centro (Berkovitz et al., 2017).

Através desta estrutura tubular, as substâncias aplicadas à superfície externa conseguem-se difundir, sendo capazes de atingir e afetar a polpa dentária. Assim, componentes de materiais dentários, ou condicionadores usados para a preparação da sua colocação, nomeadamente adesivos, podem passar através da dentina e desencadear mecanismos potencialmente prejudiciais nas células da polpa (Berkovitz et al., 2017).

É de notar que a dentina não é um tecido uniforme ao longo do dente, diferentes tipos podem ser designados de acordo com a sua localização e formação (Bath-Balog & Fehrenbach, 2012).

A dentina cariada, ou desmineralizada, é composta por duas camadas, uma superficial e outra mais profunda. A primeira, corresponde à dentina infetada, por isso caracteristicamente é muito desmineralizada devido à invasão bacteriana e não possui a capacidade de remineralizar, logo deverá ser eliminada clinicamente na sua totalidade. Por outro lado, na segunda, a dentina está afetada, possuindo uma desmineralização moderada, mas mantém a possibilidade de remineralização (Sezinando, 2014).

Esta dentina em comparação com a dentina sã, apresenta um menor módulo de elasticidade, menor dureza e também algum grau de esclerose tubular resultante da deposição de cristais no interior dos túbulos e consequentemente uma menor permeabilidade. Para além destes aspetos é provida de maior porosidade por ter menor conteúdo mineral e quebras entre as ligações de colagénio (Shibata et al., 2016).

O aumento da porosidade e a diminuição do conteúdo mineral fazem com que o condicionamento ácido desmineralize mais profundamente e se forme uma camada híbrida imperfeita. Além disso, a presença de cristais resistentes ao ácido, que podem obliterar os túbulos dentinários, limitam a formação dos *resin tags*. Todas estas alterações estruturais evidentes na dentina afetada por cárie resultam numa diminuição das forças adesivas (Sezinando, 2014; Shibata et al., 2016).

Portanto, todas estas características tornam a adesão à dentina mais complexa do que a adesão ao esmalte, como abordado mais a diante.

1.3. Polpa Dentária

A polpa é o tecido mais interno do dente. Está contida dentro da câmara pulpar e dos canais radiculares dos dentes (Bath-Balog et al., 2012).

Do ponto de vista embriológico, forma-se a partir das células centrais da papila dentária. Assim, a polpa tem a mesma origem da dentina, pois ambas derivam da papila do germe dentário (Bath-Balog et al., 2012).

Anatomicamente, pode ser dividida em polpa coronária e polpa radicular. A primeira está localizada na câmara pulpar na porção coronária do dente, e inclui os cornos pulpares que estão voltados para as margens incisais e pontas das cúspides. A segunda localiza-se nos canais pulpares na porção radicular do dente, esta é contínua com os tecidos periapicais, através do forâmen ou dos forâmens apicais da raiz. Lateralmente à polpa, podem estender-se canais acessórios, através da dentina radicular, até aos tecidos periodontais. (Ritter et al., 2017).

Este substrato é constituído por fibras nervosas, arteríolas, capilares, vénulas, vasos linfáticos, tecido conjuntivo, substância intercelular, onde se encontram os fibroblastos, odontoblastos, macrófagos, colagénio, e outras fibras finas. As células mais abundantes da polpa são os fibroblastos, sendo os odontoblastos o segundo tipo de células mais abundante (Ritter et al., 2017).

Trata-se de um órgão especializado, responsável por quatro funções, a de formação ou desenvolvimento, no sentido em que está relacionada com a produção das dentinas primária e secundária pelos odontoblastos, nutritiva, sensorial devido à presença de fibras nervosas e aos próprios odontoblastos, responsáveis pela sensação de dor, e por fim defensiva ou reparadora devido à capacidade de responder à irritação induzida por meios mecânicos, térmicos, químicos ou bacterianos. Em casos de grave injúria, a polpa responde por meio de uma resposta inflamatória, esta inflamação pode-se tornar irreversível, podendo resultar em morte pulpar, uma vez que o tecido pulpar está

confinado a uma estrutura rígida da dentina que limita a resposta inflamatória e a habilidade de a polpa se recuperar (Ritter et al., 2017).

Alguns estudos referem que, em situações como a ligação a cavidades profundas, os monómeros de resina presentes nos agentes adesivos podem difundir-se através dos túbulos dentinários, da camada fina de dentina remanescente, e chegar à polpa dentária, em concentrações consideradas tóxicas para as células destes tecidos. Isto pode desencadear respostas celulares e tecidulares como processos inflamatórios, que por sua vez podem induzir hipersensibilidade transitória após procedimentos restauradores, e/ou exigir tratamento endodôntico em alguns casos em que não haja remissão de sintomas (Kierklo, Pawińska, Tokajuk, Popławska & Bielawska, 2012; Massaro et al., 2019).

2. Adesão

Existe uma ampla aplicação para os procedimentos adesivos na área da Medicina Dentária, quer a título preventivo, quer a título restaurador. Alguns exemplos são restaurações de lesões provocadas por cárie ou trauma, adesão de fragmentos de dentes fraturados, alteração da forma, dimensão e/ou cor das estruturas dentárias, reparação de restaurações pré-existentes em cerâmica, metalo-cerâmica, amálgama ou compósito, cimentação de brackets ortodônticos, tratamento da sensibilidade dentária, aplicação de selantes e cimentação de postes e núcleos metálicos fundidos (Perdigão, Swift & Walter, 2014).

A Sociedade Americana para Testes e Materiais (especificação D 907) define adesão como “o estado no qual duas superfícies são mantidas juntas por forças interfaciais que podem consistir em forças covalentes ou forças de interpenetração mecânica, ou a interação de ambas” (Ritter et al., 2017).

O adesivo é um material, que normalmente se apresenta como um fluido viscoso, e é usado como um agente intermediário, isto é, atua como auxílio à inserção de materiais restauradores (Ritter et al., 2017).

Um sistema adesivo engloba três componentes principais, os quais podem ser usados em passos separados ou em conjunto, como será identificado mais à frente, quando explicado os diferentes sistemas que existem no mercado. Estes componentes são o ácido, o primer e o *bond*.

O ácido é formado por moléculas acídicas, normalmente aplicado em forma de um gel de ácido ortofosfórico, numa concentração geralmente a 37%, que posteriormente deve ser lavado e secado. As suas funções são: provocar a desmineralização do esmalte e da dentina, o que por sua vez irá causar a exposição dos túbulos dentinários e o aumento da permeabilidade da dentina; e remoção da *smear-layer* e *smear plugs* (Coelho, Canta, Martins, Oliveira, & Marques, 2012; Breschi, Ferracane, Cadenaro, Mazzoni, & Hilton, 2013).

Os *primers* contêm na sua composição moléculas bifuncionais com propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. Estes encontram-se dissolvidos em diferentes solventes, nomeadamente o álcool, a água e a acetona, que além de proporcionarem uma melhoria

da molhabilidade da dentina hidrofílica, ainda têm, cada um, contribuições específicas para melhorar a adesão (Anusavice, Shen, & Rawls, 2013c).

As suas funções baseiam-se na premissa de aumentar a energia de superfície da dentina e melhorar a molhabilidade do colagénio e dos espaços entre as suas fibras, mantendo esta rede expandida ao mesmo tempo que tornam a dentina, um substrato tipicamente hidrofílico mais hidrofóbico, ao deslocar a água em excesso, de modo a permitir a infiltração dos monómeros hidrofílicos contidos no adesivo (Anusavice et al., 2013c).

Por fim, o *bond* baseia-se numa resina adesiva, desprovida de solventes, composta por monómeros essencialmente hidrofóbicos, capazes de penetrar na superfície preparada. Após a infiltração dos monómeros, o *primer* coopolimeriza com o *bond*, formando as *resin tags* e resultando na camada híbrida (Sousa & Moro, 2014; Sofan et al., 2017).

Para um sistema adesivo podemos determinar três funções essenciais, sendo estas: promover resistência à separação de um substrato aderente, de um material restaurador ou de cimentação; distribuir tensão ao longo da superfície de adesão; e por fim selar a interface, entre a dentina e/ou esmalte e o material restaurador. Estes encargos garantem um aumento na resistência à microfiltração e consequente diminuição do risco de sensibilidade pós-operatória, alterações de cor a nível marginal e cárie secundária (Anusavice et al., 2013c).

Existem quatro possíveis mecanismos, dos quais resulta a adesão entre o substrato dentário e os materiais resinosos, são estes a (1) adesão mecânica, que ocorre quando há a penetração da resina e formação da camada híbrida e de *resin tags* na estrutura dentária; a (2) absorção, que acontece quando se forma uma ligação química com a componente inorgânica (hidroxiapatite) ou orgânica (essencialmente colagénio tipo I) da estrutura dentária; por fim a (3) adesão por difusão, que ocorre quando se dá a precipitação de substâncias sobre a superfície dentária às quais monómeros resinosos se ligam quer mecanicamente, quer quimicamente (Perdigão et al., 2014).

A energia de superfície e molhamento, a interpenetração, ou seja, a formação da camada híbrida, a retenção micromecânica e a adesão química são tudo fatores que, em certa medida, influenciam a adesão (Anusavice et al., 2013c).

A molhabilidade é a capacidade de um líquido estabelecer contacto com um sólido e é demonstrada pelo ângulo de contacto formado entre os dois, o que faz dela uma

característica fulcral para que seja alcançada uma boa adesão (Anusavice et al., 2013a; Anusavice et al., 2013b).

Por definição, se um adesivo não for capaz de molhar a superfície, não se conseguirá obter retenção micromecânica, adesão química ou redes interpenetrantes, com a mesma. Não se verificando estas condições, o adesivo não tem a capacidade de se espalhar sobre a superfície e penetrar por capilaridade em quaisquer irregularidades, micro ou submicroscópicas, não atingindo então um íntimo contato com a superfície, o que irá impossibilitar a obtenção de uma adesão adequada (Anusavice et al., 2013c).

Outra grande influência na adesão é a presença de uma camada aderente, conhecida como *smear layer*, formada por restos dentários, biofilme bacteriano, sangue, saliva e outras substâncias, proveniente do preparo mecânico do esmalte e da dentina, nomeadamente por aparelhos rotativos abrasivos e /ou cortantes, que ao se depositar à superfície impede o estabelecimento de uma boa adesão (Anusavice et al., 2013c).

Para além destes fatores supramencionados, outras variáveis influenciam a adesão, nomeadamente a tensão superficial do adesivo, limpeza do substrato, viscosidade do adesivo, rugosidade do substrato, alterações dimensionais resultantes da polimerização, e a estabilidade hidrolítica do adesivo (Anusavice et al., 2013b).

2.1. Adesão ao Esmalte

O esmalte, é um substrato liso, que após o condicionamento ácido sofre uma transformação tornando-se irregular, o que aumenta a sua energia livre de superfície. O ácido fosfórico promove a sua desmineralização o que conseqüentemente dá origem à criação de microporosidades. Ao aplicar-se um material resinoso líquido na superfície irregular condicionada, estas microporosidades são preenchidas, através de capilaridade, por monómeros resinosos hidrofóbicos, que estão contidos no adesivo (Ritter et al., 2017).

Após a polimerização, formam-se prolongamentos microscópicos resinosos, os *resin tags*, que proporcionam a retenção micromecânica da restauração sendo este o mecanismo fundamental da adesão resina-esmalte (Perdigão et al., 2014; Ritter et al., 2017).

Uma vez que o esmalte é um substrato homogêneo, cria-se com a técnica de condicionamento ácido, condições ideais para a adesão, conferindo à restauração uma boa durabilidade (Arinelli, Pereira, Prado & Rabello, 2016; Perdigão et al., 2014).

Porém a superfície externa do esmalte, não desgastado, é na maioria das áreas, aprismática, e por isso mais mineralizada e resistente à cárie dentária. Este atributo pode explicar o porquê, de o condicionamento ácido só aumentar a adesão caso seja suficiente para penetrar até à camada prismática do esmalte (Berkovitz et al., 2017).

2.2. Adesão à dentina

Na dentina, o processo de adesão é bem mais complexo. Esta dificuldade, está relacionada com a elevada humidade e com a composição mais orgânica presente neste tecido, ao contrário do esmalte que apresenta um conteúdo mineral elevado (Alex, 2015).

Além destes fatores, observa-se a camada de *smear layer*, que fica depositada na superfície de dentina, assim como dentro dos túbulos dentinários, formando os *smearplugs*. Estes detritos reduzem de uma forma considerável a permeabilidade da dentina, o que por sua vez diminui o fluxo do fluido dentinário (Perdigão et al., 2013a).

Devido a estas características distintas da dentina, o mesmo ácido fosfórico quando aplicado neste substrato age de modo distinto ao que acontece no esmalte. O condicionamento ácido vai resultar numa remoção completa da camada de detritos, e desmineralizar a dentina com consequente exposição das fibras de colagénio (Arinelli et al., 2016).

Com a demonstração em 1982, por Nakabayashi e seus colaboradores, da possibilidade de infiltração dos monómeros resinosos na dentina condicionada, nasceu então um novo conceito, o conceito da camada híbrida (Alex, 2015; Muñoz et al., 2013).

A camada híbrida é “uma estrutura formada nos tecidos dentários duros, pela desmineralização da superfície, seguida pela infiltração e polimerização dos monómeros”

(Rosa, Piva & Silva, 2015). Na composição desta camada podemos encontrar hidroxiapatite residual, vestígios de água, colagénio e resina (Perdigão et al., 2014)

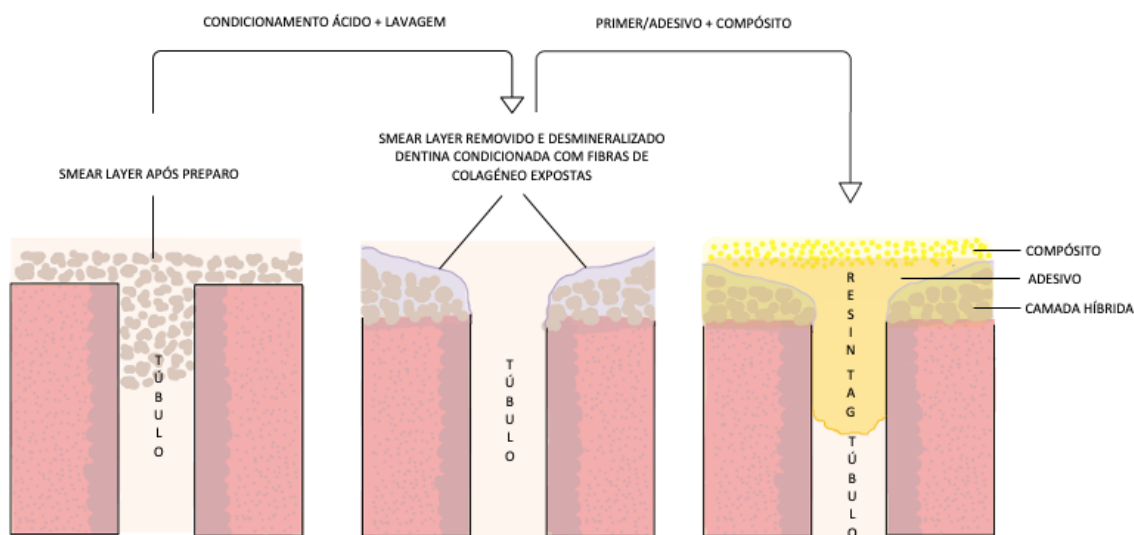


Figura 2. Esquema exemplificativo da adesão à dentina.

Em oposição ao esmalte, que necessita estar completamente seco para que se verifique uma boa resistência de união com as resinas hidrofóbicas, a dentina condicionada deverá manter-se húmida de forma a garantir a formação da camada híbrida (Perdigão et al., 2014).

A formação desta camada está dependente da infiltração do adesivo resinoso, não havendo água remanescente suficiente na dentina condicionada, a rede de colagénio tenderia a colapsar, formando-se assim uma zona relativamente impermeável à infiltração. Por outro lado, água em excesso também condiciona a adesão, pois a infiltração da resina é incapaz de provocar a completa deslocação da água, o que por si tenderá a criar um ambiente mais passível de infiltrações a longo prazo (Anusavice et al., 2013c).

A quantidade de água remanescente na dentina condicionada revela-se então como uma condição crítica para uma adequada adesão à dentina, o que resulta em que o controle da humidade dentinária seja um desafio para os clínicos (Perdigão et al., 2014).

Além disto, um sobrecondicionamento ácido da dentina também poderá ser um fator de falha aquando a formação da camada híbrida. Neste caso, uma vez que a profundidade de

desmineralização seria maior que a de infiltração dos monómeros resinosos, tenderia a existir uma zona mais profunda de fibras de colagénio expostas. Assim, estas fibras não envolvidas tendem a sofrer uma hidrólise lenta, devido à penetração de fluídos externos ou dentinários o que consequentemente compromete a durabilidade da adesão (Arinelli et al., 2016).

2.3. Classificação dos Sistemas Adesivos

Como anteriormente mencionado, a dentisteria adesiva sofreu grandes avanços nas últimas décadas. À luz da dentisteria minimamente invasiva, essa nova abordagem promove um design das cavidades mais conservador, que depende da eficácia dos atuais adesivos esmalte-dentina.

Desde a origem da dentisteria restauradora contemporânea, em 1955, oito gerações diferentes de adesivos, que constituem a camada intermediária entre o preenchimento dentário e o esmalte ou dentina, foram introduzidas (Zecin-Deren et al., 2020).

As três primeiras gerações, conhecidas como *No-etch*, forneciam resistência adesiva insuficiente e foram retiradas do uso clínico. Com a mudança das tecnologias, os adesivos dentários evoluíram de *No-etch* para *Total-etch*, quarta e quinta geração, estes sistemas consistem no condicionamento com ácido fosfórico do esmalte e dentina, a fim de criar porosidades, o que aumenta a superfície de adesão dos tecidos dentários, e por fim a sexta, sétima e oitava geração são formadas por adesivos *Self-etch* (Zecin-Deren et al., 2020).

Os sistemas adesivos podem ser classificados a partir de vários parâmetros: (1) a geração a que pertencem; (2) o solvente do sistema adesivo; (3) a forma de tratamento da *smear layer*; (4) o número de passos clínicos que requerem (Breschi et al., 2013).

Van Meerbeek e colaboradores propuseram, em 2003, a classificação que melhor caracteriza cientificamente os sistemas adesivos. Esta considera a ação dos adesivos sobre a *smear layer* e o número de passos envolvidos na sua aplicação. Ou seja, a classificação baseia-se em dois métodos genéricos de condicionamento, aplicação do *primer* e do adesivo às superfícies de esmalte e dentina, e só então subdividida de acordo com o número de passos envolvidos no processo. Assim, as categorias principais dos sistemas adesivos são conhecidas como *Etch-and-Rinse* (Condicionamento prévio / convencionais

/ *total-etch*) ou *self-etch* (autocondicionantes), com duas subcategorias, cada uma de acordo com o número de passos clínicos envolvidos (Figura 3) (Anusavice, 2013c).

Recentemente, surgiu no mercado, uma nova categoria de sistemas adesivos, que apresenta a versatilidade de poder ser aplicada sobre as estruturas dentárias tanto pela técnica convencional quanto pela autocondicionante. Estes novos adesivos são denominados adesivos universais ou multimodais (Wagner, Wendler, Petschelt, Belli & Lohbauer, 2014).

2.3.1. Adesivos *Etch-and-Rinse*

Estes adesivos caracterizam-se pela aplicação prévia e isolada de um ácido forte, o ácido fosfórico, sobre as estruturas dentárias. Esta categoria de sistema adesivo está disponível para o uso em três passos ou em dois passos clínicos. Nos sistemas adesivos de três passos (quarta geração), o *primer* e o adesivo são aplicados separadamente, enquanto que nos sistemas de dois passos (quinta geração), o *primer* e o adesivo encontram-se numa única solução (Rosa et al., 2015; Wagner et al., 2014).

A principal desvantagem destes sistemas relaciona-se com o *over-etching*, ou seja, se houver uma desmineralização demasiado profunda, poderá proporcionar a existência de espaços, no interior da camada híbrida, que não sejam penetrados na totalidade, o que tenderá a originar sensibilidade pós-operatória e nanoinfiltração, ficando comprometida a durabilidade da restauração (Delbons et al., 2015; Beltrami, Chiesa, Scribante, Allegretti, & Poggio, 2016).

No entanto, os adesivos *Etch and Rinse* são ainda hoje considerados os “*golden standard*” da adesão dentária (Rosa et al., 2015).

2.3.2. Adesivos *Self-Etch*

O propósito da evolução dos diferentes tipos de sistemas adesivos tem-se baseado em grande parte na diminuição do tempo de trabalho e facilidade da técnica de aplicação, com vista a alcançar este objetivo, surgiram os sistemas adesivos *Self-Etch* (Van Meerbeek et al., 2003).

Ao contrário dos *Etch-and-Rinse*, estes não apresentam a necessidade de um passo prévio e isolado para a aplicação do ácido, uma vez que já contém um primer ácido, composto essencialmente por monómeros funcionais de baixo pH, que atuam simultaneamente como condicionador e *primer* (Van Meerbeek et al., 2003). Esta composição resulta em que os produtos derivados da desmineralização, assim como da *smear layer* dissolvida, sejam incorporados na própria interface adesiva (Van Meerbeek et al., 2011; Giannini et al., 2015).

Deste modo, pela remoção incompleta destes detritos, antecipa-se a reidratação imediata resultante do movimento do fluido dentinário e, consequentemente, reduz-se a ocorrência de sensibilidade pós-operatória (Muñoz et al., 2015).

Pela presença de monómeros ácidos hidrofílicos, estes adesivos tornam-se mais tolerantes à presença de água na superfície dentária. Este facto, faz deles os sistemas adesivos de eleição no tecido dentinário (Beltrami et al., 2016). Contudo, não são tão eficazes no esmalte, pois a efetividade destes monómeros ácidos no esmalte, é inferior, quando comparada com a do condicionamento com ácido ortofosfórico (Takamizawa et al., 2015).

Estes sistemas, estão disponíveis para o uso em dois passos, em que o *primer* ácido e o adesivo são aplicados em separado, ou num único passo, em que o *primer* ácido e o adesivo são aplicados simultaneamente (“*all-in-one*”) (Rosa et al., 2015).

2.3.3. Adesivos Universais

Mais recentemente, uma nova categoria de sistemas adesivos foi lançada no mercado. Esta surge com o intuito de tornar o procedimento clínico mais simplificado, mais rápido e versátil, permitindo, então, que possa ser usada de acordo com qualquer tipo de estratégia adesiva e em todas as situações clínicas, este sistema é também conhecido como multi-modo (Loguercio et al., 2015; Sai et al., 2018; Papadogiannis, Dimitriadi, Zafiropoulou, Gaintantzopoulou, & Eliades, 2019).

Estes adesivos foram idealizados a partir do conceito já existente, “*all-in-one*”, nos SE de um único passo, mantendo assim a característica de ter todos os seus componentes num só frasco. A particularidade destes sistemas diz respeito à sua versatilidade pelo facto de

poderem ser aplicados segundo diferentes estratégias adesivas, nomeadamente: como sistemas do tipo *Etch-and-Rinse* (de dois passos); como sistemas *Self-Etch* (de um passo) ou na forma de *Selective Enamel Etching* (Rosa et al., 2015).

Esta última técnica, de condicionamento seletivo ao esmalte, expressa vantagens uma vez que pode ser usado o sistema *Self-Etch* de um passo, tanto na dentina como no esmalte, desde que haja anteriormente um condicionamento seletivo ao esmalte com ácido ortofosfórico (Perdigão et al., 2014). Porém em certas preparações, torna-se complicado condicionar apenas o esmalte, e involuntariamente a dentina poderá ser condicionada, tal situação é vista como uma desvantagem, uma vez que, poderá levar a uma diminuição das forças adesivas (Sezinando et al., 2015).

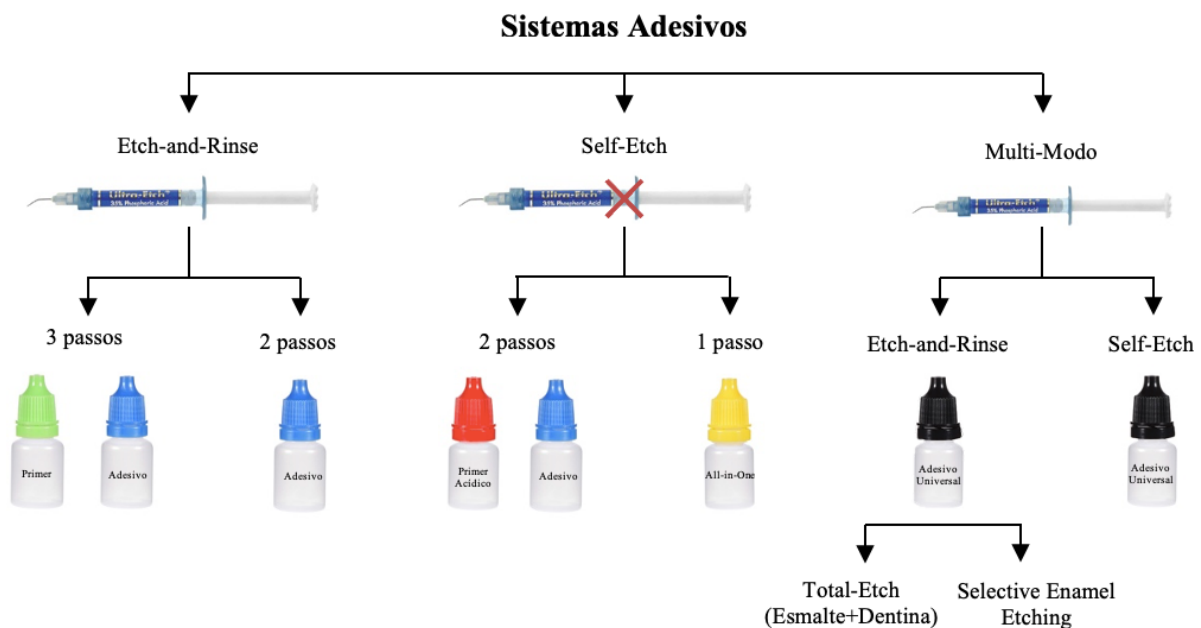


Figura 3. Classificação dos sistemas adesivos.

3. Biocompatibilidade

Os adesivos são materiais que têm uma relação direta e duradoura com substratos dentários, sobretudo com a dentina vital, tornando-se assim a biocompatibilidade destas soluções uma propriedade de importância primordial.

Como tal, a taxa crescente de desenvolvimento da dentisteria adesiva levou a uma maior consciência relativamente aos riscos biológicos dos materiais aplicados sobre o dente, o que tendencialmente, tem proporcionado uma maior procura por materiais com a capacidade de manter uma relação estável e inerte com os tecidos biológicos.

Existem diferentes descrições para a biocompatibilidade, mas em geral, a biocompatibilidade refere-se à medida da resposta biológica de um corpo a um material aplicado de forma especificamente pretendida (Tadin et al., 2016). Para definir biocompatibilidade podemos dizer que se trata da compatibilidade de um material com um tecido/sistema vivo por não ser tóxico, prejudicial, fisiologicamente reativo ou incluindo a rejeição imunológica (Shahi et al., 2019).

Assim, um biomaterial é uma substância que pode ser usada em contacto com um corpo, a longo prazo, e que tem como objetivo, tratar ou substituir tecidos, órgãos ou as suas funções (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2009).

Um material é considerado tóxico quando tem a capacidade de causar efeitos nocivos à saúde e danificar o sistema biológico. Estes efeitos podem ser locais, quando ocorrem no sítio de aplicação, ou sistémicos, quando a resposta adversa ocorre noutro local (Tadin et al., 2016).

O termo de citotoxicidade é usado para descrever os efeitos a nível das células, ou seja, é a capacidade intrínseca de um material em promover alteração metabólica nas células, podendo culminar ou não em morte celular (Tadin et al., 2016).

No caso dos sistemas adesivos, estes atuam com vista a auxiliar na substituição de tecido dentário perdido. Idealmente, todos os materiais dentários deveriam ser biocompatíveis ou capazes de funcionar *in vivo* sem desencadear uma resposta intolerável no corpo, quer localmente quer sistemicamente. Porém, a maioria dos materiais contém componentes potencialmente prejudiciais ou irritantes para os tecidos (Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2009).

Geralmente, na formulação química dos sistemas adesivos encontramos monómeros bifuncionais e monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos. Os monómeros hidrofóbicos são utilizados para a ligação do compósito e formação da rede polimérica, o bisfenol A glicidil metacrilato (Bis-GMA), o uretano dimetacrilato (UDMA) e o trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA), são exemplos presentes nos sistemas adesivos. Já os monómeros hidrofílicos, incluem o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e o 4-metacriloxi-etil-trimetilato-anidrido (4-META), que são requeridos para garantir a penetração adesiva às fibras de colagénio da dentina desmineralizada, uma vez que são hidrofílicas (Pagano et al., 2019). Para além disto, a mistura adesiva, compreende geralmente outras substâncias, nomeadamente os solventes como a água, o álcool e a acetona. As aminas aromáticas, os iniciadores de polimerização, inibidores ou estabilizadores, *fillers* inorgânicos e inibidores estão também presentes nas formulações (Elias et al., 2015).

Devido ao facto de os adesivos disponíveis no mercado não serem totalmente capazes de selar hermeticamente a dentina profunda, foi demonstrado, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, que em certas situações, após a aplicação de agentes adesivos na dentina já condicionada, alguns monómeros residuais, resultantes do processo de degradação ou da polimerização incompleta, assim como outros componentes dos sistemas adesivos, podem penetrar e difundir-se através dos túbulos dentinários e consequentemente chegarem até à polpa dentária, este fenómeno poderá desencadear respostas celulares e tecidulares como processos inflamatórios (Elias et al., 2015; Massaro et al., 2019).

Portanto, a toxicidade dos adesivos pode ser responsabilizada a curto prazo pela libertação que ocorre devido à polimerização incompleta, ou a longo prazo, com a progressiva degradação e libertação das substâncias lixiviáveis (Goldberg, 2008; Tadin et al., 2016).

Esta difusão que ocorre através da dentina até à polpa está dependente de diversas variáveis, estando nestas incluídas a espessura e permeabilidade da dentina remanescente, a área de exposição, a presença ou ausência da *smear layer* e a taxa de fluxo sanguíneo pulpar (Tadin et al., 2016).

Para chegar a conclusões relativamente aos componentes tóxicos dos adesivos, têm sido feitos diversos estudos. Estes, têm demonstrado que certos monómeros resinosos tradicionalmente presentes na composição dos sistemas adesivos, nomeadamente o HEMA, BIS-GMA, UDMA e TEGDMA têm um certo grau de citotoxicidade, que está dependente do tempo e da concentração.

O HEMA, tem como função melhorar a molhabilidade e a difusão do adesivo. É o monómero hidrofílicos mais comumente presente nos sistemas adesivos, com possui a capacidade para penetrar pelos túbulos dentinários. Estudos determinaram que pode induzir, em certos casos, reações de hipersensibilidade, suprimir o crescimento de algumas células, alterar o ciclo celular e até ativar a apoptose (Falconi, et al., 2007; Tadin et al., 2016).

O Bis-GMA também é considerado citotóxico, tendo a capacidade de alterar o ciclo celular e induzir stress oxidativo levando à apoptose e necrose celular. (Chang et al., 2010).

O UDMA é usado para fornecer maior compatibilidade entre a água e os adesivos, de modo a ter um comportamento semelhante quer na dentina húmida, quer seca. Porém foi relatado que este composto é capaz de induzir mudanças morfológicas das células da polpa, diminuir a viabilidade celular e até provocar necrose (Chang et al., 2014).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o TEGMA induz toxicidade em fibroblastos humanos associada à depleção precoce e drástica da glutathione, com subsequente produção de ROS, atraso na proliferação celular, e processos de mineralização (Tadin et al., 2016).

Para além destes monómeros também os iniciadores têm sido associados a níveis de citotoxicidade, devido à sua capacidade para gerar radicais livres, uma vez que podem induzir a paragem do ciclo celular e apoptose, e provocar alterações na renovação da matriz e reparação pulpar, assim como a canforquinona, uma proativador geralmente usado (Chang et al., 2015).

O glutaraldeído é uma substância, também presente na composição de alguns adesivos, que é conhecida como sendo tóxica, mutagénica e alergénica, sendo nociva quando em contacto direto com os tecidos mucosos ou por inalação da sua forma evaporada (Tadin et al., 2016).

Outro aspeto que deve ser considerado, quando nos referimos à toxicidade dos adesivos, é a presença de solventes, uma vez que estes, devido à sua capacidade de aumentar a solubilidade dos adesivos dentários, vão consequentemente aumentar a libertação de monómeros residuais, o que por sua vez poderá aumentar os efeitos tóxicos dos sistemas adesivos (Massaro et al., 2019).

Resumindo, estes compostos, presentes na maioria dos sistemas adesivos atuais, podem induzir genotoxicidade, citotocixidade, atividade alérgica, estrogénica e mutagénica e podem comprometer as funções celulares básicas, tais como modificações no metabolismo lipídico, na concentração de glutathione (GSH), na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), no ciclo celular, no metabolismo energético e atividade mitocondrial, induzindo também, simultaneamente, alterações na morfologia celular e integridade da membrana (Maluf, Freitas, Cintia, Camila, & Pulpo, 2015; Bianchi et al., 2013; Prica et al., 2013; Tadin et al., 2013).

3.1. Estudos *in vitro*

Como anteriormente referido, quando um novo sistema adesivo é desenvolvido, é indispensável a realização de testes laboratoriais para demonstrar o tipo de toxicidade do material (Maluf et al., 2015). Devido à padronização e reprodutibilidade dos ensaios feitos em culturas celulares, os testes de citotoxicidade *in vitro* são os primeiros a serem utilizados, só depois os testes *in vivo* e os testes clínicos (Silva, et al. 2014; Pupo et al., 2017).

Os testes *in vitro* são conduzidos fora do organismo vivo, com o propósito de simular a resposta biológica do material (Tadin et al., 2016). Através deste método consegue-se obter rapidamente classificações sensíveis, convenientes, reprodutíveis e de custo relativamente baixo (Silva et al., 2014).

O objetivo de um teste de citotoxicidade é determinar como é que uma amostra de um material afeta determinado tipo de célula. A premissa destes testes é que o material não deverá afetar o número de células e o seu crescimento, a integridade e expressão genética, a integridade da membrana, e a atividade enzimática das células (Narvekar & Ramamoorthi, 2015).

A *International Organization Standardization* (ISO) e o *Council on Dental Materials Instruments and Equipment of the American Dental Association* recomendam a realização de vários testes *in vitro*, uma vez que não é possível determinar a biocompatibilidade com apenas um teste.

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser medida através da atividade enzimática, utilizando substratos específicos como o MTT ou utilizando corantes vitais como o vermelho neutro, cristal violeta, *tripan blue*, entre outros (Moharamzadeh, Brook, & Noort, 2009).

3.1.1. Teste de Redução do MTT

O ensaio do Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, conhecido como teste de redução do MTT foi descrito por Mosmann, em 1983 e tem sido desde então vastamente utilizado para mesurar a viabilidade celular e consequentemente auxiliar na determinação da biocompatibilidade dos diferentes materiais dentários (Mosmann, 1983).

Trata-se de um teste colorimétrico, versátil e quantitativo, que permite medir a quantidade de células viáveis, através da avaliação da atividade das enzimas presentes nas mitocôndrias das células vivas, depois de incubadas com agentes potencialmente tóxicos (Borenfreund, Babich & Martin-Alguacil, 1988).

O MTT é baseado na redução do sal de tetrazólio, uma substância solúvel em água, de cor amarela, em formazan, um precipitado insolúvel de cristais cor azul/púrpura. Todo este processo é realizado pela ação das enzimas mitocondriais, as desidrogenases succínicas, que fazem a biorredução (Wang et al., 2010).

Os cristais formados são posteriormente dissolvidos, com o auxílio de solventes orgânicos, como o Dimetilsulfóxido (DMSO), e a absorvância resultante desta solução pode ser quantificada através de um leitor de microplacas.

A absorvância é a quantidade de luz absorvida por uma solução. A concentração de uma solução pode ser calculada pela sua absorvância, usando a lei de *Lambert-Beer*, esta estabelece uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática colimada (raios luminosos paralelos) (Knetsch, 2013).

A viabilidade celular é proporcional à quantidade de sal reduzido, consequentemente quanto maior for a absorvância espectrofotométrica maior o número de cristais de formazan formados pela atividade mitocondrial, logo maior será o número de células

viáveis na cultura celular, o que significa que um menor número de células terá sofrido alterações pelos produtos tóxicos (Knetsch, 2013).

4. OBJETIVO

Avaliar o potencial citotóxico de dois tipos de adesivos no mercado: Scotchbond Universal e Optibond Solo Plus, e um adesivo em fase experimental: T1, quando em contacto com fibroblastos de rato da linha celular 3T3 e em osteoblastos humanos da linha celular MG63.

5. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

Hipótese Nula (H_0): Não há diferenças na viabilidade celular quando em contacto com os diferentes adesivos.

Hipótese Alternativa (H_1): Há diferenças na viabilidade celular quando em contacto com os diferentes adesivos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Adesivos

Para este trabalho foram testados três tipos de adesivos descritos na tabela 1 que incluem: Scotchbond Universal, OptiBond Solo Plus e T1. Os adesivos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1. Adesivos utilizados na pesquisa.

Sistema Adesivo (Fabricante)	Classificação	Composição
Scotchbond™ Universal (3M)	Etch and Rinse de 2 passos ou Self etch de 1 passo	Bis-GMA, HEMA, etanol, água, silano tratado com sílica, ácido 2-propenóico 2-metil-, produtos de reação com 1,10-decanodiol e pentóxido de fósforo, copolímero de ácido acrílico e itacônico, CQ, 4-dimetilaminobenzoato e tolueno.
T1		Sistema de poliuretano constituído por polieterpoliol, ácido fosfórico, diisocianato de tolueno.
OptiBond™ Solo Plus (KERR)	Self-etch de 2 passos	Bis-GMA, HEMA, GPDM, água, etanol, vidro de aluminoborosilicato de bário, sílica pirogênica (dióxido de silício), hexafluorosilicato de sódio, fotoiniciador (CQ)



Figura 4. Adesivos utilizados neste estudo.

1.2. Linha Celular

1.2.1. Células 3T3

As células mais afetadas pela adesão são os fibroblastos contidos na polpa. Assim, para o estudo em causa, considerou-se pertinente a utilização de células NIH/3T3 (ATCC®CRL-1658™), que correspondem a uma linha celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de rato (3T3), que se caracterizam pelo crescimento aderente em monocamada.

Esta linha celular é largamente utilizada em testes *in vitro* de biocompatibilidade devido às propriedades semelhantes às células normais, visto que células apresentam inibição de contacto e não são tumorigénicas, daí a sua utilização regular para estudos de citotoxicidade *in vitro*, sendo considerados como fibroblastos de referência (Thonemann, Schmalz, Hiller, & Schweikl, 2002).

Em cultura, as células 3T3 apresentam uma forma fusiforme, com núcleo central e prolongamentos citoplasmáticos típicos (Gentile, Medda, Cheng, Battista, Scopelliti, Milani, Adam, & Decuzzi, 2013).

1.2.2. Células MG63

A linha celular MG63 (ATCC® CRL-1427™) apresenta um fenótipo bastante similar ao dos osteoblastos. Como tal, é amplamente utilizada pela sua facilidade de acesso e alta representatividade do comportamento osteoblástico. Para além disto, são células mais resistentes às condições de stress que as células primárias.

Apesar de ser uma linha de células tumorais, estas células *osteoblast-like* exibem muitos traços osteoblásticos, sendo estes característicos das células formadoras de osso.

O uso de uma linha celular secundária, como esta, oferece algumas vantagens, nomeadamente a ausência da variabilidade individual, existente nas linhagens primárias, e uma melhor reprodutibilidade. Além disso, permite a comparação com outro tipo de células muito abundantes na polpa e neste caso de origem humana.

Assim, as células MG63 representam um modelo para estudos *in vitro*, de biocompatibilidade, adequado (Rodrigues, 2011).

1.3. Reagentes

Tabela 2. Reagentes utilizados na pesquisa.

Reagente	Fonte
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT); 99% puro	Sigma M5655
Solução de Tripán Blue (0,4%); filtrado-esterilizado	Sigma T8154
Dimetilsulfóxido (DMSO): filtrado-esterilizado para congelar celular	Sigma D2650
Dimetilsulfóxido (DMSO); 99% puro para dissolver MTT	Sigma D5879
Phosphate-Buffered Saline (Tampão fosfato, PBS) 10x; pH 6,0-7,0	Sigma D1408
Trypsin-EDTA solution; filtrado-esterilizado; pH 6,4-7,0 (para diluir em PBS 1x)	Sigma T4174

Tabela 3. Composição do meio completo DMEM (células 3T3).

Guardado	Stock e concentração	Quantidade para 500ml	Concentração final	
4°C	DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas	450 ml		Sigma-Aldrich ref: D5671(s/ glutamine)
-20°C	Bovine Calf serum. Antes de aliquotar e guardar a -20°C descomplementar a 56°C x 30 min	50 ml		Sigma-Aldrich 12133C
4°C	NEM 100xc (<i>Non-essential Amino Acid solution</i>) filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas de acordo com o meio comprador)	5 ml		Invitrogen (Gibco) ref: 11140-035
4°C	Piruvato de Sódio (PNA) 100 mM (100xc)	5 ml	1 mM	Sigma S8636
4°C	Pen10000U/ml/Streptomicina 10 mg/ml	5 ml	100U/ml 100 µg/ml	Sigma P4333
-20°C	Fungizona (Anfoterizina B) filtrado e esterilizado 250 µg/ml	5 ml	2,5 µg/ml	Invitrogen (Gibco) ref: 15290-026

Tabela 4. Composição do meio completo EMEM (células MG63).

Guardado	Stock e concentração	Quantidade para 500ml	Concentração final	
4°C	EMEM, <i>Minimum Essential Medium Eagle</i>	450 ml		Sigma-Aldrick ref: D5650(s/ glutamine)
-20°C	<i>Fetal Bovine Serum</i> . Antes de aliquotar e guardar a -20°C descomplementar a 56°C x 30 min	50 ml		Sigma-F4135
4°C	NEM 100xc (<i>Non-essential Amino Acid solution</i>) filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas de acordo com o meio comprador)	5 ml	1x	Invitrogen (Gibco) ref: 11140-035
4°C	Piruvato de Sódio (PNA) 100 mM (100xc)	5 ml	1 mM	Sigma S8636
4°C	Pen10000U/ml/Streptomicina 10 mg/ml	5 ml	100U/ml 100 µg/ml	Sigma P4333
-20°C	Glutamina 20mM	5 ml	2 mM	

1.1. Equipamentos do laboratório de cultura de células

O equipamento utilizado para realizar esta investigação, encontra-se no laboratório de Biologia Molecular e na Sala de Cultura de Células.

Tabela 5. Equipamentos usados no estudo.

Equipamento Técnico/Modelo	Marca
Microscópio Ótico Invertido	Axiovert® 25, Zeiss, EUA
Estufa de CO ₂	Panasonic MCO-18AC-PE
Centrífuga, modelo 3-16PK	Sigma®, Londres, Reino Unido
Leitor de microplacas Platos R 496	Diagnostics
Câmara de fluxo laminar MarsSafetyClass 2	Sheldon
Banho Maria Grant Sub 14	Grant
Balança de precisão M-Power mod.AZ214	SartoriusTM, Goettingen, Alemanha
Hemocitómetro de Neubauer modelo Zazi	Neubauer-improved® Zazi
Pipetador Automático	Labnet FastPette Plus
Micropipetas p20, p200 e p1000	Gilson®, Middleton, EUA
Pipeta multicanal BioPette 50-300ul	BioPette Autoclavable
Fotopolimerizador DB 686	COXO®
Orbital Shaker PSU-20i	Grant-bio

Tabela 6. Material descartável utilizado neste estudo.

Material descartável	Marca
Criotubos	Nunc®, Nova Iorque, EUA
Frascos de Cultura 25 cm² (T25) e 75cm²	Sarstedt®, Nümbrecht, Alemanha
Parafilm	-----
Placas de 96 poços	VWR International®, Xangai, China
Placas de Petri com 5,1 cm de diâmetro	VWR International®, Xangai China
Tubos de <i>Falcon</i> cónicos (15ml e 50ml)	DentalabTM, Madrid, Espanha
Pontas para pipetas	-----
Pipetas Graduadas 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	-----
Filtros com 0,45 µm de poro	-----
Seringa	-----

2. MÉTODOS

Para o estudo da citotoxicidade dos adesivos dentários, foi usada a sala de Cultura de Células, do Instituto Universitário Egas Moniz.

A manipulação das células, meio de cultura e adesivos dentários, assim como os reagentes e soluções utilizados neste estudo, foi realizada em condições de assepsia, com recurso a material estéril numa câmara de fluxo laminar.

Todos os materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente estéreis, ou foram esterilizados previamente ao seu uso.

2.1. Preparação da Cultura de Células:

Para iniciar todos os ensaios experimentais realizados ao longo desta investigação, descongelou-se uma amostra de células 3T3 (ATCC®CRL-1658TM) e uma amostra de células MG63 (ATCC® CRL-1427TM), de forma a obter células em boas condições fisiológicas nos dias em que se fizeram os ensaios.

O método de conservação de células consiste no seu armazenamento em criotubos, num contentor com azoto líquido à temperatura de -140°C em 10% DMEM, no caso das células 3T3 e 10% EMEM no caso das células MG63, 80% de soro e 10% de DMSO. Uma vez

retirados os criotubos com a amostra de células, deu-se início ao seu rápido descongelamento através da suspensão dos criotubos em banho-maria a 37°C, segundo as normas ISO 10993-5:2009.

Após o processo de descongelação estar concluído, o conteúdo foi transferido para um tubo de *Falcon* de 15 ml, ao qual se adicionou 5. ml de DMEM simples, de forma a ser possível retirar o DMSO, substância utilizada para manter a integridade das células, enquanto congeladas, mas que inibe a proliferação celular.

As células foram centrifugadas a 130 g durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet*, constituído pelas células, foi ressuspensão em 6 ml de meio completo e colocado num frasco de cultura de 25 cm² (T25).

Para cada linha celular foi usado o meio aconselhado pelo ATCC: *The Global Bioresource Center*. Na maioria das situações foi necessário usar meio completo, ou seja, os meios descritos nas tabelas 3 e 4, sendo o meio simples (meios com todos os componentes das tabelas 3 e 4, exceto o soro) utilizado apenas para a diluição de MTT.

Após descongelamento e remoção do DMSO, as células foram incubadas a 37° C numa estufa com atmosfera húmida e com 5% de CO₂, para proliferarem até atingirem uma confluência de cerca de 80% (isto é, 80% da superfície do frasco de cultura estava coberto por uma monocamada de células). O meio foi substituído de acordo a necessidade celular (cerca de 2 vezes por semana). A morfologia e densidade das células foi verificado ao microscópio ótico invertido (MOI).

Uma vez alcançada esta confluência (figura 5), realizaram-se subculturas.

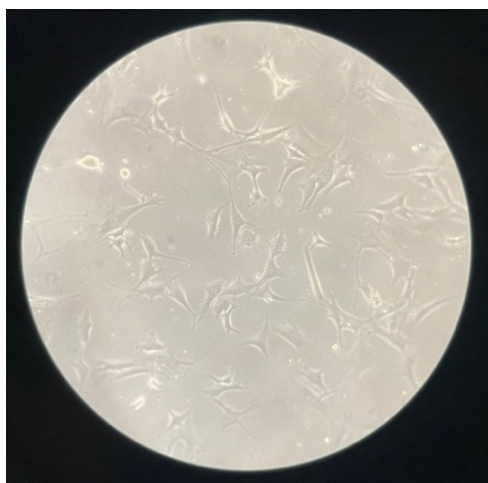


Figura 5. Células 3T3 não confluentes (MOI contraste de fase 200x).

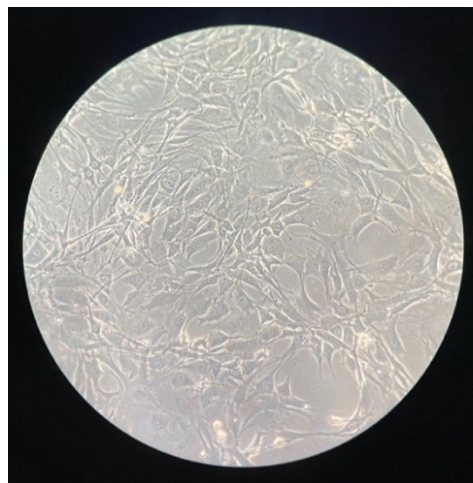


Figura 6. Células 3T3 confluentes (MOI contraste de fase 200x).

2.1.1. Subculturas

As subculturas fazem-se utilizando as células da cultura mãe após um processo de tripsinização. A tripsina é uma enzima que vai provocar a hidrólise das proteínas que fazem a adesão das células à parede dos frascos de cultura, possibilitando então o destacamento das mesmas.

Para isto, fez-se a aspiração do meio de cultura celular, lavagem das células com tampão fosfato (PBS) 0,01M e posterior adição de uma solução de tripsina a 0,25mg/mL.

A tripsina atuou à temperatura ambiente por 5 minutos, após os quais foi adicionado meio completo para inativar a tripsina, num volume três vezes superior ao de tripsina.

A suspensão celular foi transferida para um tubo de *Falcon* e centrifugada, durante 5 minutos a 130g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 1 ml de meio completo.

As células foram semeadas em frascos de cultura T25 ou T75, no respetivo meio de cultura completo.

Este processo pode-se repetir 10 a 15 vezes, depois do descongelamento das células, de acordo com a Norma ISO 10993-5:2009, o que significa que os testes de viabilidade celular foram realizados com células com este número de passagens.

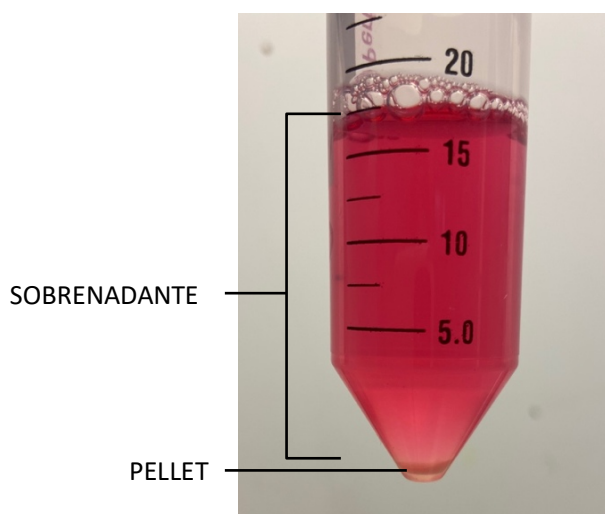


Figura 7. Presença de *pellet* após centrifugação.

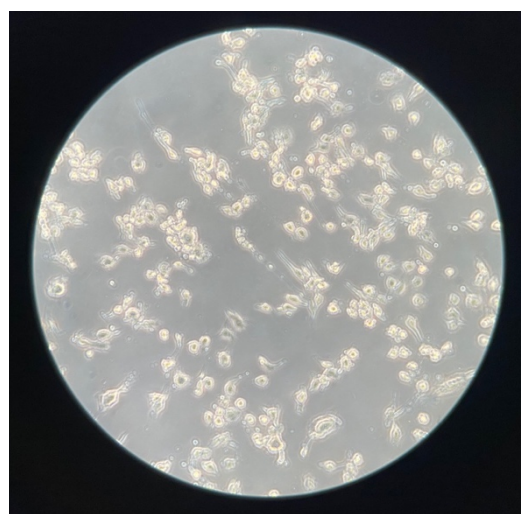


Figura 8. Células destacadas após tripsinização.

2.1.2. Contagem de Células em Suspensão

O número de células foi calculado, utilizando uma câmara de *Neubauer* (hemacitômetro). Para esta contagem utilizou-se o corante, Azul Tripano (0,4%), que não tem a capacidade de penetrar a membrana de uma célula viva, porém ultrapassa sem dificuldade a membrana de uma célula morta ou moribunda. Deste modo, foi possível contar apenas as células que nos interessavam, ou seja, as células viáveis e excluir as células mortas que ficam coradas de azul. Para contagem do nº de células utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração} = \frac{\text{Nº de células contadas}}{4} \times \frac{1}{2^{-1}} \times \frac{1}{10^{-4}} \text{ ml}$$



$$\text{Nº de células/ml} = \text{média do nº de células} \times \text{diluição} \times \text{volume de 16 quadrados}$$

Adicionaram-se 15 µl de corante azul de tripano 0,5% (p/v) e 15 µl da suspensão celular a analisar, sobre uma película de *parafilm* e misturou-se com uma pipeta.

De seguida, retiraram-se 15 µl desta diluição que foram colocados, por capilaridade, numa câmara de *Neubauer* onde as células vivas foram contadas nos 4 conjuntos de 16 quadrados da câmara de contagem, com o auxílio do microscópio ótico (ampliação 100x).

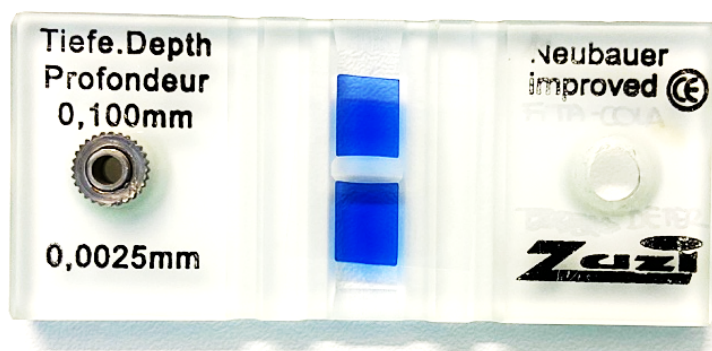


Figura 9. Câmara de *Neubauer* com lamela e solução para contagem de células.

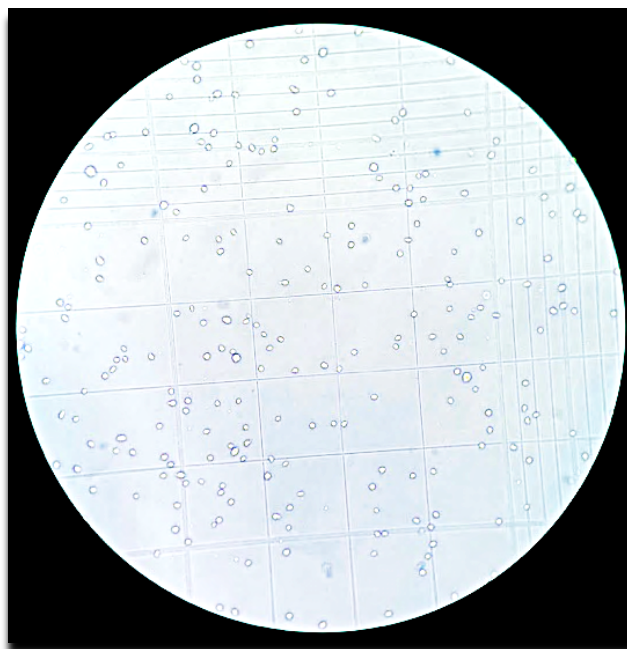


Figura 10. Observação das células nos quadrados de contagem da câmara de *Neubauer* (MOI ampliação 100x).

2.2. Determinação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada em ensaios de proliferação, designados por ensaios de MTT, em função da atividade de uma enzima mitocondrial que catalisa a conversão de um sal solúvel em água, o MTT (3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2-il) - 2,5-difeniltetrazólio), num composto insolúvel, o cristal de formazan. O MTT é metabolicamente reduzido apenas em células viáveis e deixa a sua cor amarela, para passar a ser azul-violeta.

Esta reação é catalisada pela succinato desidrogenase mitocondrial (SDH), ativa apenas em células viáveis. Assim, pode-se correlacionar o número de células viáveis com a intensidade da cor, esta é determinada por medidas fotométricas após a dissolução do formazan num solvente orgânico.

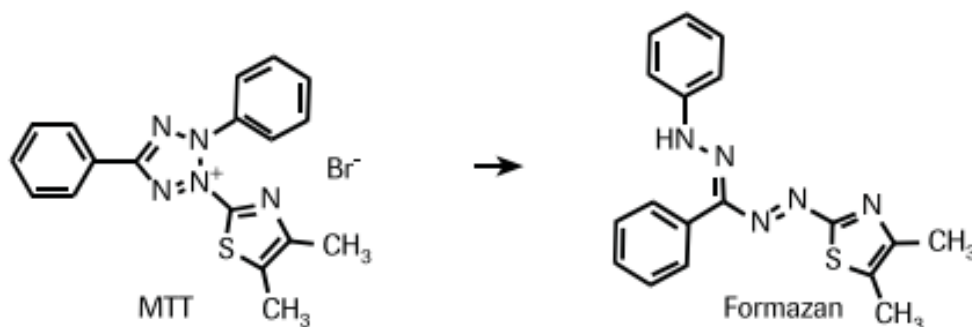


Figura 11. Conversão do MTT em Formazan.

2.3. Preparação dos Tóxicos (Extratos dos Adesivos):

Cada sistema adesivo Scotchbond Universal, Optibond Solo Plus e T1 foi aplicado, em separado, em caixas de *petri* com 5,1cm de diâmetro (20,41 cm²). Para a sua aplicação usou-se um *microbrush* para pincelar o fundo de cada placa de *petri* (Figura 12).

SC e OP são adesivos fotopolimerizáveis. Para a sua polimerização utilizou-se um fotopolimerizador, aparelho de luz LED (previamente avaliado quanto à intensidade de luz em radiômetro e calibrado em 1200mW/cm²), que foi colocado a cerca de 5 mm da amostra, em áreas distintas de modo a abranger toda a superfície, durante 20 segundos (de acordo com o fabricante).

No caso no sistema adesivo T1, a sua polimerização foi induzida com água. Adicionou-se 10% de água e colocou-se na estufa, para uma reação mais rápida.

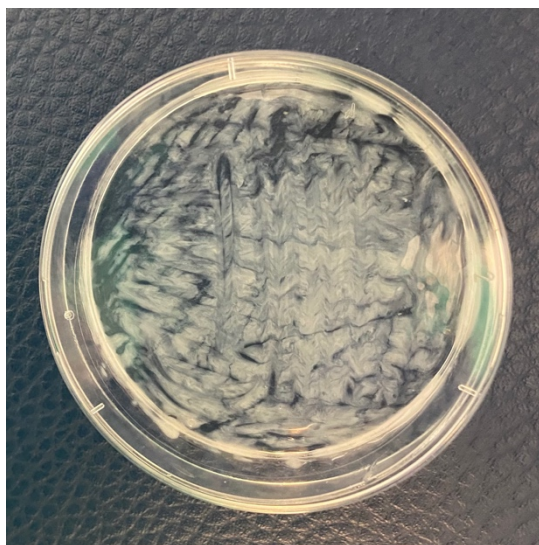


Figura 12. Preparação da amostra do adesivo T1 após polimerização.

Os adesivos polimerizados ficaram em contacto com o meio de cultura correspondente, DMEM ou EMEM. Segundo as normas ISO 10993-12 para cada 6 cm² de tóxico usa-se 1 ml de meio, por isso foi adicionado 3,4 ml de meio completo por placa de *petri*.

As placas foram incubadas durante 24 h numa estufa com atmosfera húmida e 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, em alguns ensaios os meios de cultura contendo os componentes lixiviados dos sistemas adesivos foram recolhidos e esterilizados por filtração, através de membranas com 0,45 µm de poro, para obtenção de extratos estéreis e mais homogêneos.

Os grupos escolhidos para estes ensaios estão representados na tabela 7.

Tabela 7. Descrição dos grupos usados na presente investigação.

<i>Grupo</i>	<i>Descrição</i>
<i>T1 – 3T3</i>	Extrato de DMEM contendo extratos obtidos do adesivo T1.
<i>S – 3T3</i>	Extrato de DMEM contendo extratos obtidos do adesivo Scotchbond Universal.
<i>OP – 3T3</i>	Extrato de DMEM contendo extratos obtidos do adesivo Optibond Solo Plus.
<i>T1 – MG63</i>	Extrato de EMEM contendo extratos obtidos do adesivo T1.
<i>S – MG63</i>	Extrato de EMEM contendo extratos obtidos do adesivo Scotchbond Universal.
<i>OP – MG63</i>	Extrato de EMEM contendo extratos obtidos do adesivo Optibond Solo Plus.

2.4. Ensaio do MTT

Segundo as normas ISO10993-5 é possível determinar os efeitos citotóxicos por meios qualitativos ou quantitativos, sendo estes últimos preferíveis. A avaliação quantitativa pelo ensaio MTT mede a morte celular.

Para o ensaio de MTT foram utilizadas placas com 96 poços, sendo colocado em cada um uma quantidade definida de células, definida previamente por ensaios de otimização do número de células. Nestes ensaios, as células em meio completo foram incubadas por um período de 24 horas para que se desse a sua adesão aos poços (figura 13).

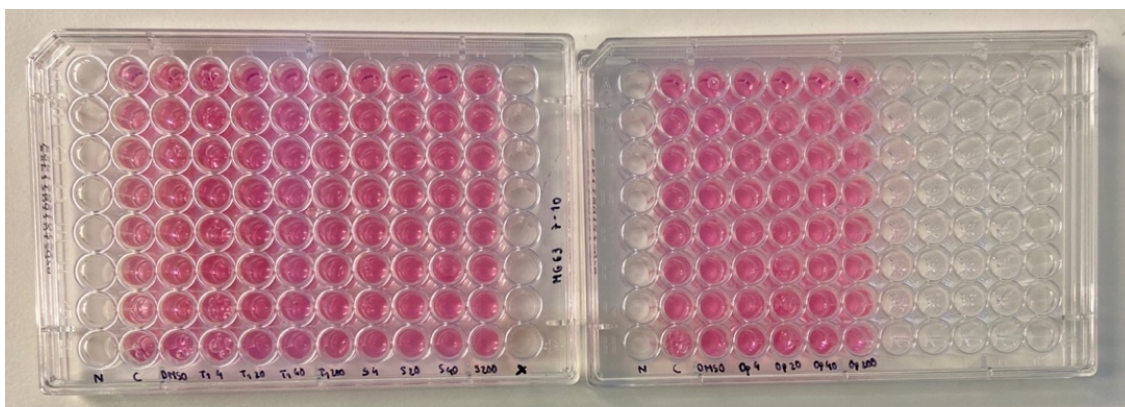


Figura 13. Placa de 96 poços preenchida com células e meio completo.

Após a adesão celular, as células 3T3 e MG63 foram incubadas por um novo período de 24 horas, com diferentes diluições dos extratos de cada um dos tóxicos, de modo a se determinar quantitativamente os efeitos citotóxicos.

Terminado este período foi adicionada uma solução de MTT diluída (0,5 mg/mL) a cada poço e a placa foi incubada a 37° na estufa de CO₂ por um período de 3h.

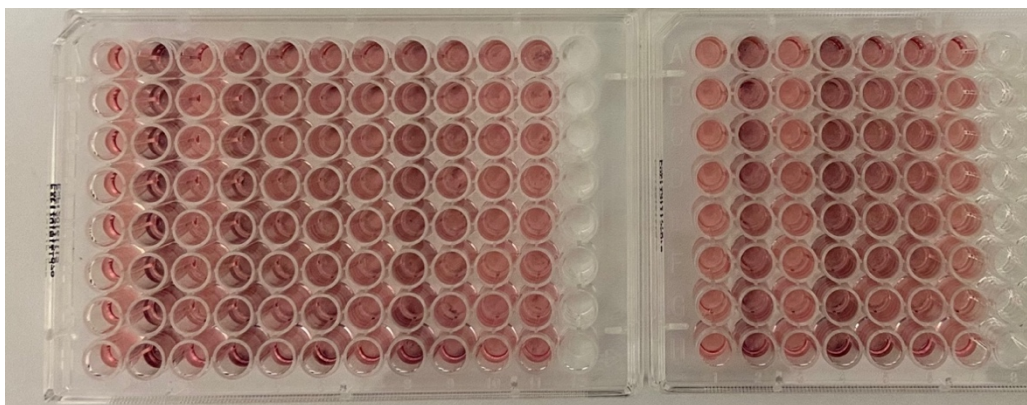


Figura 14. Placa de 96 poços após 3 horas de incubação com o MTT, com formação de precipitados azul- violeta.

Após estas horas (figura 14), foi adicionado solvente de MTT a cada poço (figura 15), e a placa foi colocada num *orbital shaker* (figura 16) durante 1 hora, a 100 rpm, para a uma dissolução completa dos cristais de MTT.



Figura 15. *Orbital-Shaker* (PSU-20i Grant-bio)

Após a dissolução dos cristais de MTT observa-se uma placa semelhante à representada na imagem 16. As cores na placa permitem fazer uma avaliação qualitativa. A degradação da cor azul-violeta coincide com a diminuição a diluição dos tóxicos. A amarelo ficam as colunas que têm uma quantidade diminuta ou inexistente de células viáveis.

Para uma análise quantitativa as placas foram lidas num leitor de microplacas (figura 17).

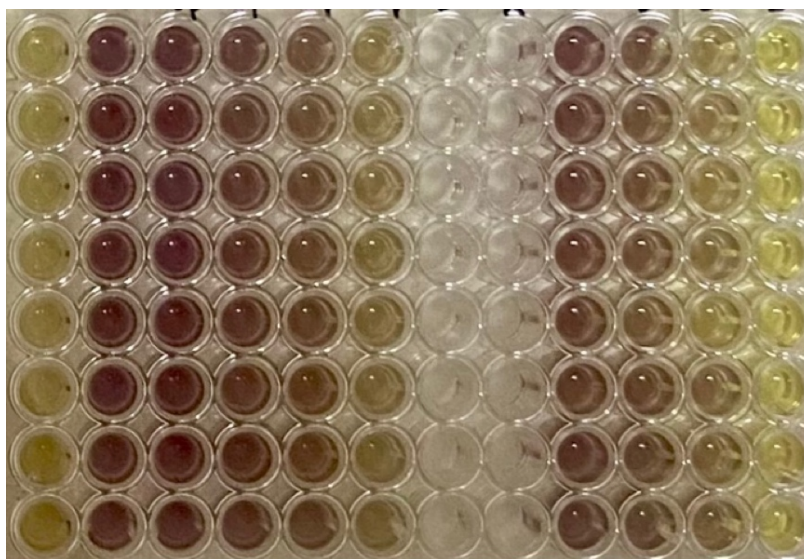


Figura 16. Imagem exemplificativa da coloração das diferentes colunas após ensaio de MTT.



Figura 17. Leitor de microplacas (Platos R 496, Diagnostics)

Na figura 18, está apresentado um esquema ilustrativo da sequência dos procedimentos realizados nos diferentes ensaios de MTT:

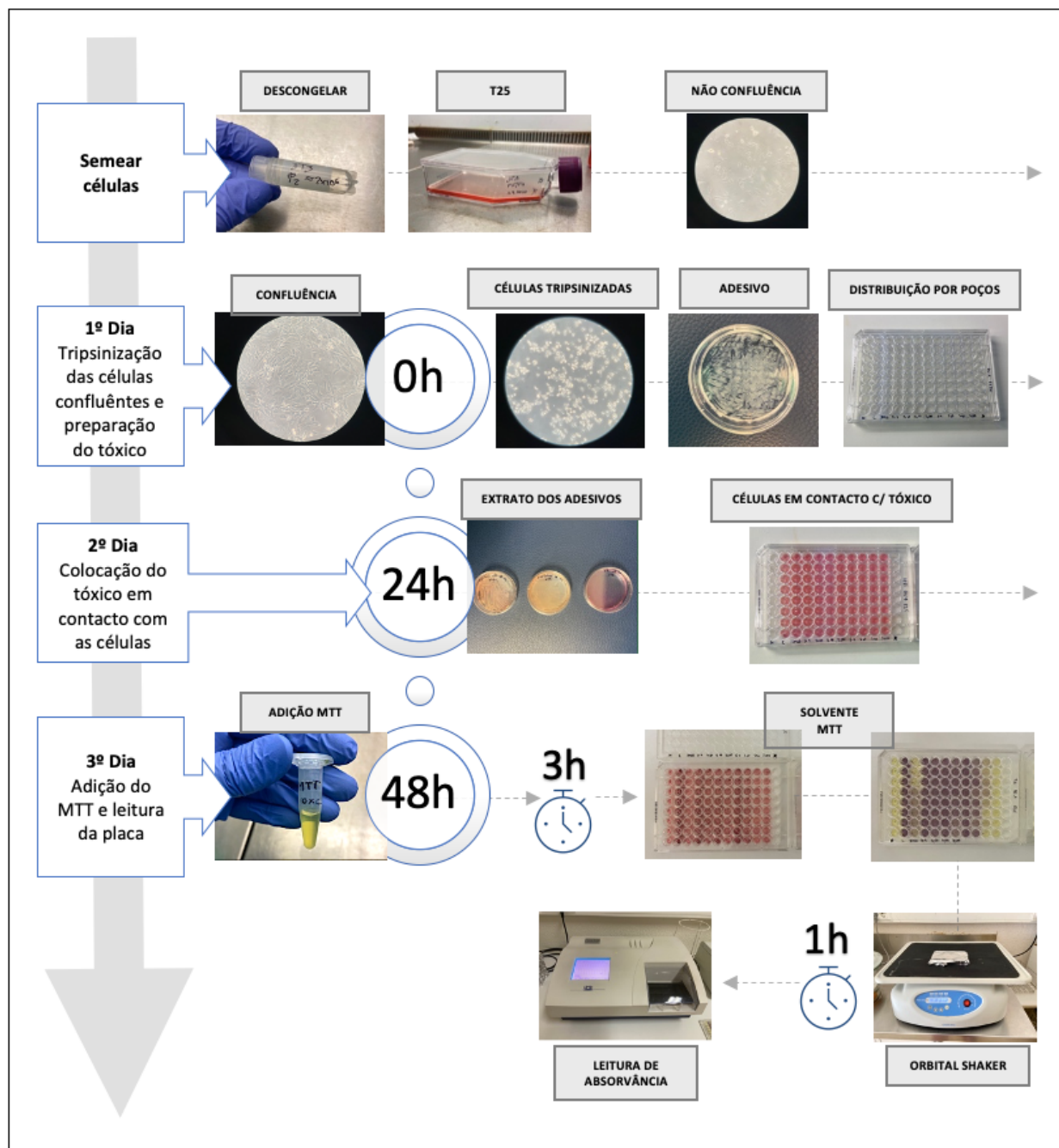


Figura 18. Esquema ilustrativo da sequência de procedimentos num ensaio de MTT.

A. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:

Após a otimização do número de células a utilizar em cada poço no ensaio do MTT, efetuaram-se os ensaios de MTT com os extratos de cada adesivo em contacto com as células. Para este ensaio os fibroblastos 3T3 foram cultivados nos poços de uma placa de cultura de 96 poços, a uma concentração de 10^4 células por poço, num volume de 200 μl de DMEM completo, e foram incubados a 37° C, numa atmosfera húmida com 5% de CO_2 , durante 24 horas.

Foram igualmente preparados os extratos dos adesivos, como descrito anteriormente (figura 19).



Figura 19. Preparação dos extratos dos adesivos em placas de petri, para as células 3T3.

Por norma cada coluna foi preenchida com uma mesma diluição de cada tipo de extrato, ou seja, 8 poços para cada uma das diluições. Porém em alguns ensaios por falta de células suficientes utilizaram-se apenas 6 poços. A cada poço foi então adicionado um volume total de 200 μl de tóxico nas diferentes diluições, representadas na tabela 8.

Tabela 8. Diluições dos extratos usadas nos ensaios de MTT.

Diluição Final	μl do extrato dos adesivos	μl de DMEM completo	Volume total
1:1	200 μl	0 μl	200 μl
1:5	40 μl	160 μl	
1:10	20 μl	180 μl	
1:50	4 μl	196 μl	

Como controlo negativo de citotoxicidade, uma coluna de 6 ou 8 poços foi preenchida com 200 µl de células em DMEM completo.

Como controlo positivo, as células foram expostas a DMSO a 7,5%, uma vez que a esta concentração este composto é citotóxico.

Estas condições foram mantidas por um período de 24 horas após o qual, a solução contida em cada poço foi removida, sendo substituída por 100 µl de solução de MTT em cada poço. O MTT foi deixado em contacto com as células durante 3 horas para que ocorresse a formação de cristais de formazan.

Uma vez terminadas estas 3 horas, foram adicionados 150 µl de solvente de MTT e fez-se pipetagens sucessivas *up-and-down*. A este período seguiu-se 1 hora de agitação da placa num *orbital shaker* e foram então lidas as absorvâncias no leitor de placas.

B. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos com filtração:

As normas ISO 10993-12 referem que não deve ser efetuado, por rotina, qualquer tipo de filtração, centrifugação ou outro método para remover as partículas em suspensão dos extratos. Porém o adesivo Scotchbond Universal e o adesivo Optibond Solo Plus, após a adição do meio à placa de *petri* ficaram com demasiadas partículas em suspensão (figura 20). Estas provavelmente interferem nos resultados absorvância nos diferentes poços, visto não ser possível garantir que as partículas em suspensão se distribuísem de igual forma por cada poço.

Para confirmar o efeito das partículas em suspensão nos extratos efetuaram-se ensaios de MTT, como descritos anteriormente, mas com extratos tóxicos filtrados.

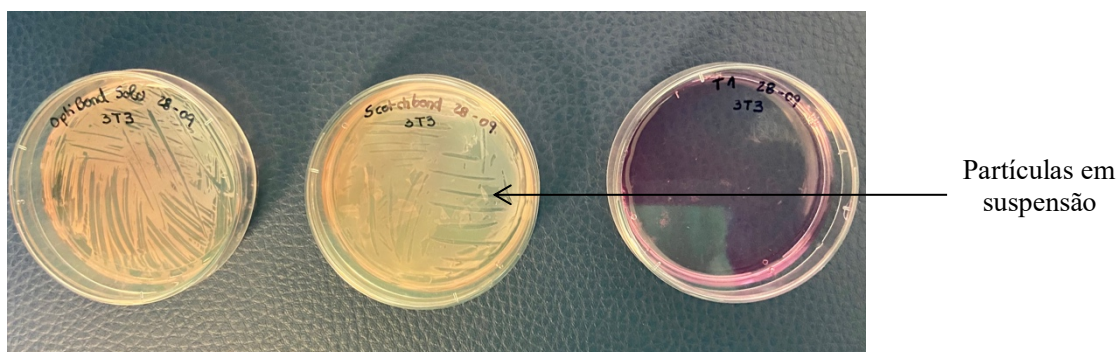


Figura 20. Partículas em suspensão no preparo dos extratos dos adesivos.

A filtração efetuou-se pela injeção dos extratos, com uma seringa, através de filtros de celulose com 0,45 μm de poro.

C. Ensaio de MTT com células MG63 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:

Para as células MG63 seguiu-se a mesma sequência supramencionada. Isto é, após a otimização do número de células a utilizar no ensaio do MTT, efetuou-se o ensaio com os extratos dos adesivos e com o número de células escolhido através do ensaio de otimização. Neste caso as células MG63 foram cultivadas numa placa de cultura de 96 poços, a uma concentração de 10^4 em 200 μl de EMEM completo, incubadas a 37° C, numa atmosfera húmida e 5% de CO_2 , por 24 horas.

Os extratos foram preparados como descrito anteriormente (figura 21) e utilizados em diluições sequenciais, como descrito na tabela 9. Cada diluição foi testada numa coluna de 8 poços, com um volume de 200 μl por poço.

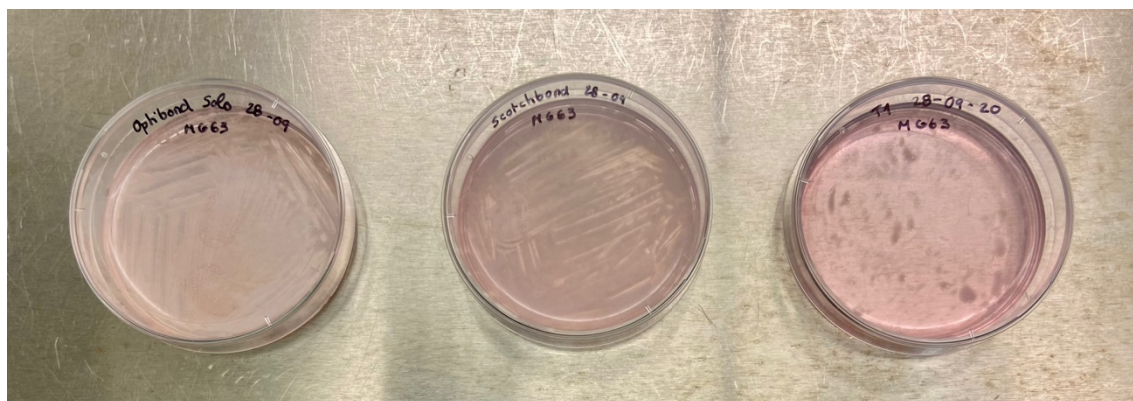


Figura 21. Preparação dos extratos dos adesivos, em placas de petri, para as células MG63.

Tabela 9. Diluições dos extratos usadas nos ensaios de MTT.

Diluição Final	μl do extrato dos adesivos	μl de EMEM completo	Volume total
1:1	200 μl	0 μl	200 μl
1:5	40 μl	160 μl	
1:10	20 μl	180 μl	
1:50	4 μl	196 μl	

2.5. Determinação da viabilidade celular:

Como referido anteriormente, a viabilidade celular está associada aos valores de absorvância resultantes da redução do MTT em formazan.

De modo a definir o efeito dos extratos incubados com os diferentes adesivos, comparou-se a viabilidade das células quando em contacto com os extratos, com a viabilidade das células do grupo controlo negativo, que não estiveram expostas aos extratos e que correspondem a 100% de viabilidade.

Após a leitura dos poços, aos valores obtidos foi subtraída a absorvância do grupo branco. O resultado obtido é depois convertido em % de viabilidade celular, por comparação entre os valores de absorvância obtidos, e o valor de absorvância das culturas de controlo negativo. Obtendo-se assim o valor da viabilidade celular de cada poço e em cada condição testada.

Segundo as normas ISO 10993-5: 2009 a diminuição do número de células vivas resulta na diminuição da atividade metabólica da amostra. Esta diminuição está correlacionada diretamente com a quantidade de formazan formado e é monitorizada pela densidade ótica num comprimento de onda de 570nm. Para calcular a redução da viabilidade faz-se uma comparação com o controlo negativo do ensaio através da equação:

$$Viabilidade \% = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

Em que:

OD_{570e} é o valor médio da densidade ótica medida nos poços com os extratos;

OD_{570b} é o valor médio da densidade ótica medida na coluna do controlo negativo.

Quanto menor a percentagem de viabilidade, maior é o potencial citotóxico da amostra.

Se a viabilidade for reduzida para < 70% do branco, o material apresenta potencial citotóxico (ISO 10993-5: 2009).

2.6. Análise Estatística

As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e para analisar as diferenças significativas utilizou-se o teste de multicomparação de Tukey HSD (*Tukey Honest Significant Difference Comparisons*). Os grupos foram comparados para verificar as diferenças num nível de significância estabelecido em $p < 0,05$ usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 26 para *Windows*.

Para o cálculo dos LD50 e os seus gráficos, usou-se o software “*Quest Graph™ LD50 Calculator*”.

III. RESULTADOS

A. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:

Os valores de absorvância obtidos após o ensaio de MTT encontram-se na tabela 10 e 11.

Tabela 10. Valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células 3T3 expostas a extratos não filtrados (placa 1).

DILUIÇÕES DOS TÓXICOS NÃO FILTRADOS NAS CÉLULAS 3T3										
BRANCO	3T3	DMSO	T1 1:50	T1 1:10	T1 1:5	T1 1:1	SC 1:50	SC 1:10	SC 1:5	SC 1:1
0,139	1,295	0,135	1,101	0,965	0,882	0,716	1,125	0,603	0,274	0,187
0,126	1,290	0,171	1,229	1,026	1,018	0,941	1,192	0,652	0,262	0,153
0,171	1,197	0,184	1,278	0,961	1,146	0,967	1,159	0,917	0,401	0,216
0,114	1,267	0,416	1,130	0,952	1,114	1,011	1,130	0,587	0,372	0,145
0,150	1,230	0,460	1,233	1,091	1,236	0,911	1,160	0,856	0,337	0,198
0,135	1,242	0,480	1,301	1,034	1,164	0,841	1,128	0,742	0,183	0,196
0,209	1,279	0,530	1,342	1,006	1,279	0,706	1,173	0,629	0,396	0,245
0,168	1,340	0,380	1,241	0,949	1,016	0,572	1,245	0,816	0,208	0,229
Média	0,152	1,268	0,345	1,232	0,998	1,107	0,833	1,164	0,725	0,304
Média-Branco		1,116	0,193	1,080	0,847	0,955	0,682	1,013	0,574	0,153
MTT		100	27	97	79	87	66	92	57	24

Tabela 11. Continuação dos valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células 3T3 expostas a extratos não filtrados (placa 2).

DILUIÇÕES DOS TÓXICOS NÃO FILTRADOS NAS CÉLULAS 3T3							
BRANCO	3T3	DMSO	OP 1:50	OP 1:10	OP 1:5	OP 1:1	
0,115	1,116	0,123	1,014	0,675	0,534	0,126	
0,123	1,197	0,127	1,135	0,755	0,575	0,124	
0,166	1,187	0,183	1,151	0,888	0,738	0,160	
0,105	1,153	0,433	1,131	0,955	0,669	0,145	
0,142	1,169	0,294	1,174	0,919	0,610	0,167	
0,128	1,130	0,151	1,167	0,839	0,789	0,142	
0,204	1,266	0,214	1,252	0,657	0,599	0,246	
0,166	1,340	0,359	1,102	0,789	0,631	0,170	
Média	0,144	1,195	0,236	1,141	0,810	0,643	0,160
Média-Branco		1,051	0,092	0,997	0,666	0,500	0,016
MTT		100	20	95	68	54	13

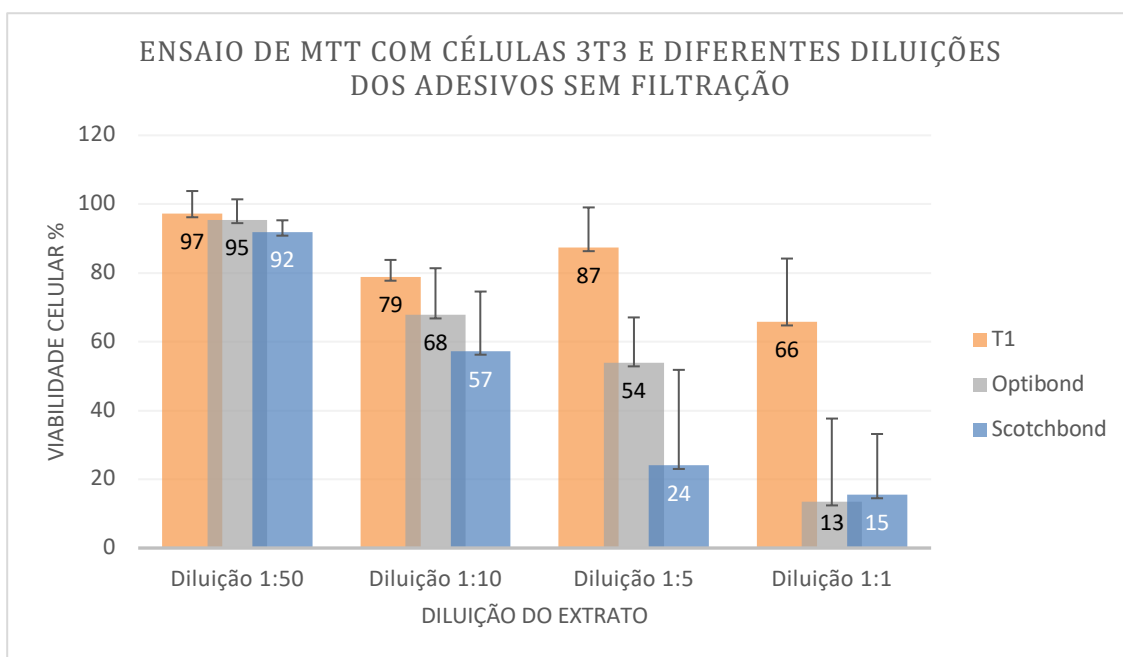


Figura 22. Gráfico representativo dos resultados do ensaio de MTT em células 3T3. Avaliação da viabilidade celular nas diferentes diluições dos adesivos sem filtração.

Os resultados obtidos foram colocados sobre a forma de um gráfico (Figura 22), onde estão representadas as percentagens de viabilidade das células expostas a diferentes concentrações dos três adesivos, T1, OP e SC.

Pela análise dos resultados colocados no gráfico (figura 22), verifica-se que o adesivo induz menores valores de viabilidade celular nas células 3T3 é o Scotchbond Universal.

Para o adesivo Scotchbond Universal, os valores de viabilidade variam entre 92% e 15%. Apenas é considerado sem potencial citotóxico na diluição de 1:50, nas diluições mais baixas a percentagem de viabilidade desce abaixo dos 70%, apresentando assim potencial citotóxico.

O adesivo OP revelou numa perspetiva geral, uma taxa de viabilidade mais alta, mas em termos de potencial de citotoxicidade corresponde ao mesmo cenário que o SC, uma vez que apenas na diluição mais alta a viabilidade celular se encontra acima dos 70%. Os valores de viabilidade variam entre 95% para a diluição maior e 13% o extrato não diluído.

Tanto o OP como o SC são adesivos existentes no mercado e comumente utilizados pelos Médicos Dentistas na sua prática clínica. Porém os resultados revelaram-se bastante diferentes para o novo adesivo, T1, ainda em fase experimental.

O T1 apresentou-se como o menos tóxico, induzindo percentagens de viabilidade muito superiores aos demais testados nestes ensaios, sendo que os seus valores variaram entre 97% e 66% de viabilidade celular. A viabilidade esteve sempre acima dos 70% quando diluído, apenas não atingindo este valor quando no extrato mais concentrado, diluição 1:1, e note-se que esta ultrapassagem foi por pouco uma vez que se encontra nos 66%.

Seria de esperar uma diminuição gradual da viabilidade com o aumento da quantidade de extrato adicionado, porém vemos uma descida demasiado acentuada na diluição 1:10, provavelmente devido a erro de manipulação.

Por observação do gráfico podemos verificar que existe uma dose-dependência para a viabilidade celular, sendo que quando se aumenta a diluição dos extratos com o adesivo há uma maior viabilidade.

Para estes dados foi realizado o teste ANOVA, com um nível de significância de $p\text{-value} \leq 0,05$. O resultado foi inferior a 0,05 o que nos confirma que há uma dose-dependência, ainda que possa haver algumas diluições em que esta associação não está clara.

B. Ensaio de MTT com células 3T3 expostas a extratos obtidos de adesivos com filtração:

Os resultados de absorvância deste ensaio encontram-se detalhados na tabela 12 e figura 23.

Tabela 12. Valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células 3T3 expostas a extratos filtrados.

DILUIÇÕES DOS TÓXICOS FILTRADOS NAS CÉLULAS 3T3														
BRANCO	3T3	DMSO	OP 1:50	OP 1:10	OP 1:5	OP 1:1	SC 1:50	SC 1:10	SC 1:5	SC 1:1	T1 1:50	T1 1:10	T1 1:5	T1 1:1
0,221	1,343	0,570	0,918	0,790	0,658	0,191	1,069	1,082	0,486	0,241	1,198	1,272	1,248	1,035
0,165	1,290	0,557	0,905	0,958	0,901	0,203	1,022	1,049	0,939	0,181	1,217	1,271	1,223	1,330
0,200	1,285	0,586	0,930	0,840	0,638	0,171	1,059	1,092	0,784	0,198	1,163	1,247	1,222	1,250
0,184	1,266	0,524	1,052	1,066	0,755	0,181	1,102	1,059	0,947	0,196	1,232	1,242	1,183	0,258
0,267	1,337	0,433	0,868	0,776	0,508	0,180	1,092	1,094	0,922	0,258	1,277	1,335	1,231	0,324
0,228	1,327	0,512	1,060	0,974	0,783	0,178	1,109	0,930	0,877	0,224	1,262	1,252	1,155	0,372
Média	0,211	1,308	0,530	0,956	0,901	0,707	0,184	1,076	1,051	0,826	0,216	1,225	1,270	0,762
Média-Branco	1,097	0,320	0,745	0,690	0,496	-0,027	0,865	0,840	0,615	0,006	1,014	1,059	1,000	0,551
MTT	100	41	73	69	54	14	82	80	63	17	94	97	93	58

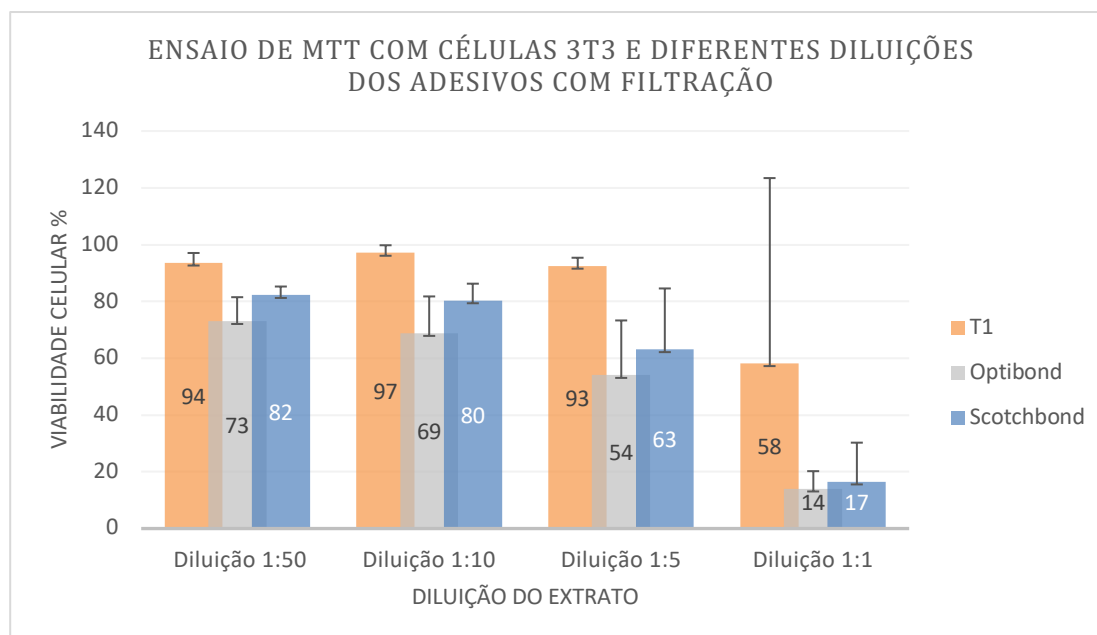


Figura 23. Gráfico representativo dos resultados do ensaio de MTT em células 3T3. Avaliação da viabilidade celular nas diferentes diluições dos adesivos com filtração.

A análise dos resultados colocados no gráfico (figura 23), permite aferir que o adesivo T1 continua a demonstrar ser menos tóxico em relação aos dois outros adesivos, sendo a percentagem de viabilidade celular quase sempre acima dos 70%. No entanto, quando colocamos o extrato do adesivo em contacto com as células sem qualquer tipo de diluição (1:1) há uma descida na percentagem de viabilidade para valores já considerados com potencial de citotoxicidade (58%), porém uma vez que houve uma grande discrepância dos resultados nesta concentração, os valores deverão ser confirmados experimentalmente.

Os valores de viabilidade para o Optibond Solo Plus variaram entre 73% e 14%. Só apresentaram valores acima dos 70% numa diluição de 1:50, ainda que na diluição 1:10 esteja bastante próximo desse valor. Das restantes diluições obtiveram-se resultados que indicam que este adesivo é potencialmente citotóxico, principalmente quando mais concentrado (1:1).

O Scotchbond Universal, indicou ser menos tóxico que o Optibond Solo Plus, no entanto continua a apresentar-se como potencialmente citotóxico a partir da diluição de 1:5.

C. Comparação dos resultados dos extratos não filtrados com os extratos filtrados, dos diferentes adesivos.

Para confirmar o efeito das partículas em suspensão nos extratos efetuaram-se ensaios de MTT, com extratos obtidos dos adesivos não filtrados e filtrados. Nos gráficos abaixo (Figura 24, 25 e 26), apresentam-se as comparações entre um mesmo adesivo, com a mesma diluição, mas com a divergência de um ser usado após filtração e outro não.

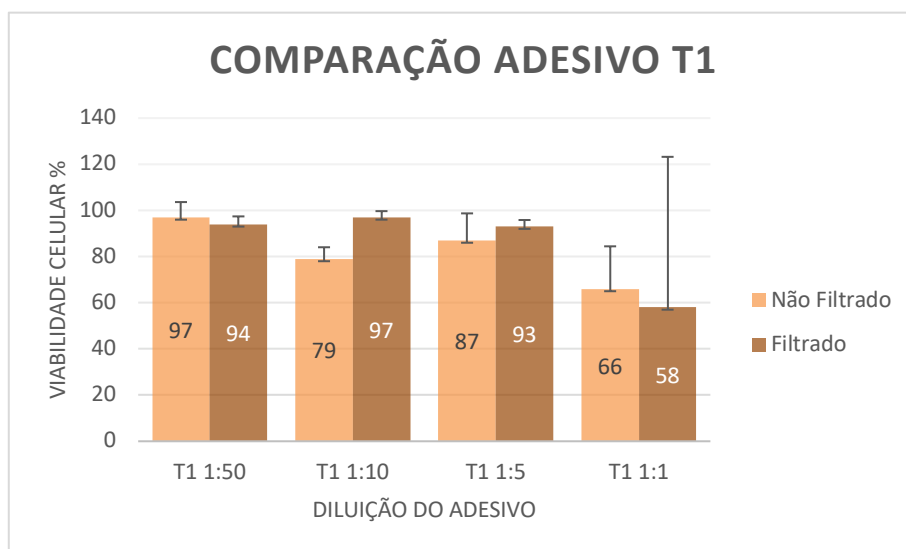


Figura 24. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 obtidos para o adesivo T1 após exposição a extratos não filtrados e filtrados.

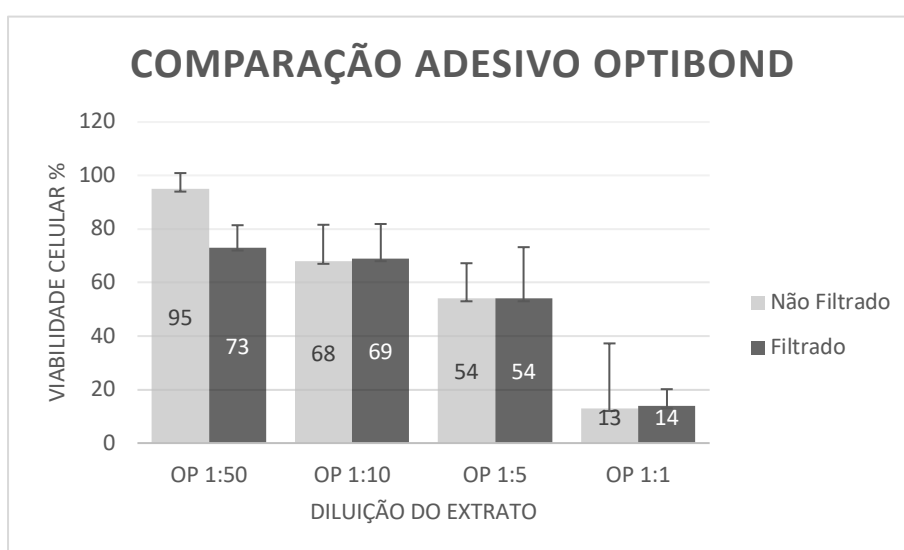


Figura 25. Comparação dos valores de viabilidade celular das células 3T3 obtidos para o adesivo Optibond após exposição a extratos não filtrados e filtrados.

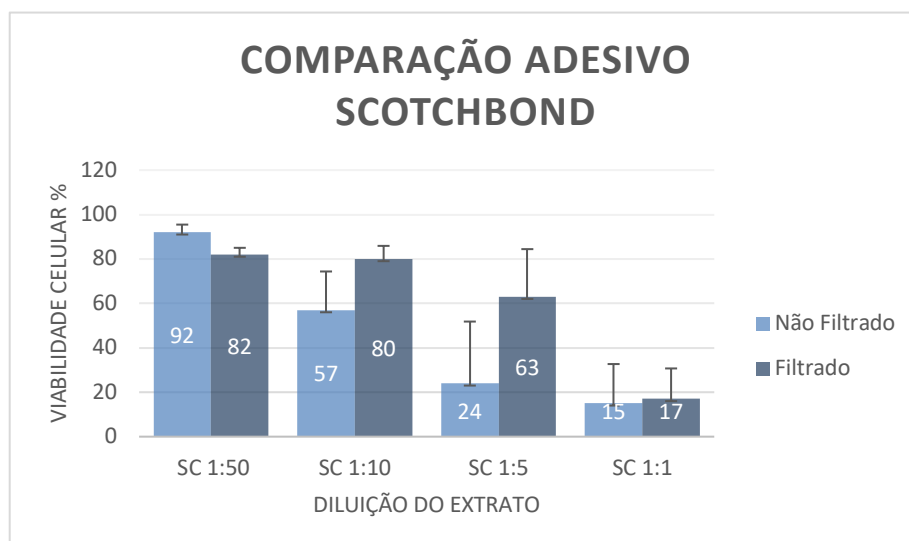


Figura 26. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 obtidos para o adesivo Scotchbond após exposição a extratos não filtrados e filtrados.

Pela análise dos resultados colocados nos gráficos (figura 24, 25 e 26) apuramos que existem diferenças claras, no que diz respeito ao adesivo Scotchbond Universal.

Esta realidade poderá estar relacionada com o facto de este ser o adesivo onde se formaram o maior número de partículas em suspensão.

Enquanto que nos resultados dos ensaios não filtrados, o Scotchbond Universal apresenta uma percentagem geral de viabilidade inferior ao Optibond Solo Plus, uma vez filtrados os resultados invertem-se, passando o SC a revelar melhores percentagens.

Note-se que tanto no OP como no T1, não se observa uma grande distinção entre ambos os resultados, possivelmente porque estes adesivos apresentavam menos partículas em suspensão.

Pela observação dos gráficos, a filtração dos extratos dos adesivos, parece ter influência sobre os resultados da viabilidade celular. Através do teste ANOVA, obteve-se resultados de $p = 0$, o que nos indica que este pressuposto é suportado estatisticamente.

Para entender realmente em que diluições esta diferença é significativa, teve que se recorrer ao teste de Tukey HSD, este fez multicomparações entre as diferentes diluições para um mesmo adesivo, sendo comparados os resultados filtrados com os não filtrados. Na tabela 13 encontram-se os resultados deste teste.

Tabela 13. Resultados para o teste de Tukey HSD que relacionam a viabilidade celular com a filtração, ou não filtração, dos extratos.

<i>Tukey Honest Significant Difference Comparisons</i>				
		T1	Optibond Solo Plus	Scotchbond Universal
		Valores de <i>p</i>		
Relação entre o resultado de viabilidade celular, de um mesmo adesivo, quanto à filtração	Dil. 1:1	0.429	1	1
	Dil. 1:5	0.949	1	0.562
	Dil. 1:10	1	1	1
	Dil. 1:50	0.308	0.029	0.349

Analisando os resultados individualmente através deste teste de Tukey HSD, verifica-se que esta diferença significativa entre extratos filtrados e não filtrados, só ocorre para o adesivo Optibond Solo Plus, quando numa concentração de 1:50. Para consolidar o pressuposto da ANOVA deverão ser feitos mais ensaios, para perceber se há mais valores com significância.

D. Ensaio de MTT com células MG63 expostas a extratos obtidos de adesivos sem filtração:

Os resultados de absorvância para as células MG63 encontram-se na tabela 14 e 15.

Tabela 14. Valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células MG633 expostas a extratos não filtrados.

DILUIÇÕES DOS TÓXICOS NÃO FILTRADOS NAS CÉLULAS MG63										
BRANCO	MG63	DMSO	T1 1:50	T1 1:10	T1 1:5	T1 1:1	SC 1:50	SC 1:10	SC 1:5	SC 1:1
0,094	0,885	0,179	0,914	0,767	0,738	0,290	0,813	0,122	0,118	0,131
0,087	0,920	0,202	0,923	0,641	0,981	0,157	0,798	0,105	0,094	0,108
0,117	0,894	0,198	0,739	0,709	0,846	0,204	0,968	0,134	0,107	0,124
0,093	0,872	0,209	0,639	0,602	1,024	0,140	0,648	0,124	0,115	0,139
0,106	0,887	0,202	0,866	0,695	0,948	0,171	0,397	0,114	0,110	0,111
0,099	0,836	0,208	0,977	0,731	0,953	0,158	0,837	0,129	0,104	0,113
0,154	1,006	0,239	1,102	0,769	1,068	0,196	0,770	0,151	0,140	0,160
0,124	1,014	0,197	0,937	0,698	0,978	0,203	0,125	0,121	0,115	0,117
Média	0,109	0,914	0,204	0,887	0,702	0,942	0,190	0,670	0,125	0,125
Média-Branco	0,805	0,095	0,778	0,592	0,833	0,081	0,560	0,016	0,004	0,016
MTT		100	22	97	77	100	21	73	14	14

Tabela 15. Continuação dos valores de absorvância obtidos pelo leitor de placas para o ensaio com células MG633 expostas a extratos não filtrados (placa 2).

DILUIÇÕES DOS TÓXICOS NÃO FILTRADOS NAS CÉLULAS MG63						
BRANCO	MG63	DMSO	OP 1:50	OP 1:10	OP 1:5	OP 1:1
0,099	0,832	0,209	0,684	0,518	0,580	0,121
0,091	0,874	0,192	0,796	0,424	0,615	0,107
0,100	0,808	0,180	0,500	0,491	0,606	0,098
0,107	0,932	0,190	0,733	0,584	0,694	0,131
0,095	0,975	0,214	0,577	0,643	0,698	0,109
0,095	0,945	0,201	0,899	0,521	0,699	0,110
0,122	0,818	0,176	0,864	0,390	0,612	0,119
0,097	0,922	0,191	0,412	0,551	0,704	0,109
Média	0,101	0,888	0,194	0,683	0,515	0,651
Média-Branco		0,745	0,051	0,540	0,372	0,507
MTT		100	22	77	58	73

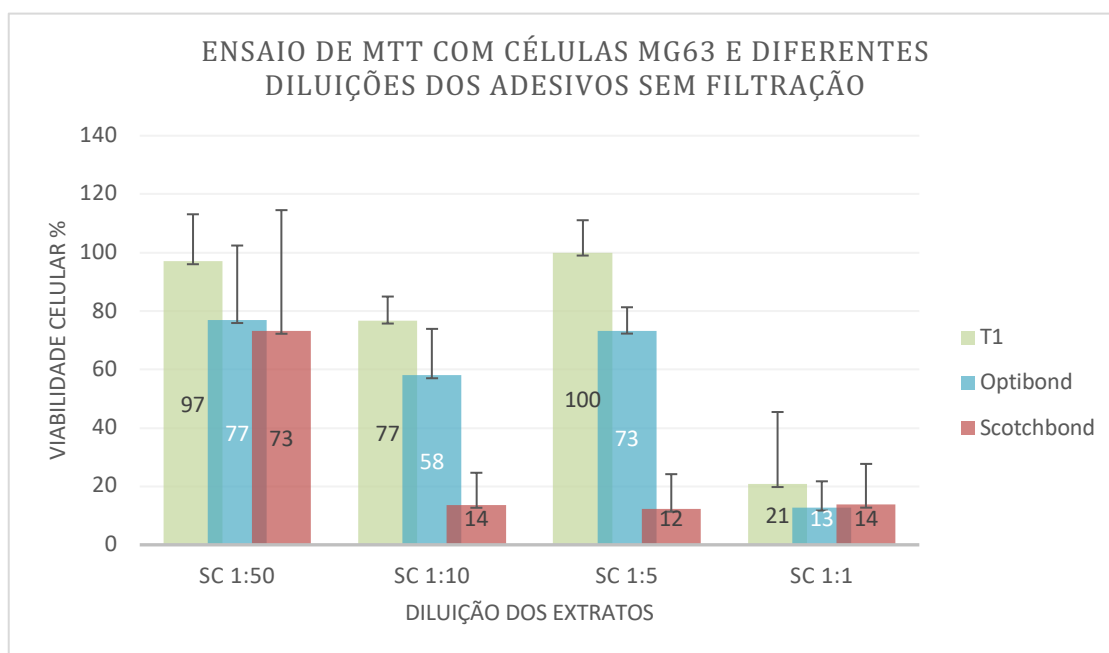


Figura 27. Gráfico representativo dos resultados do ensaio de MTT em células MG63. Avaliação da viabilidade celular nas diferentes diluições dos adesivos com filtração.

Pela análise do gráfico (figura 27) verifica-se que para as células MG63, o adesivo T1 é o que menos altera a viabilidade celular, apresentando valores de viabilidades acima dos 70%, em todas as diluições, à exceção da diluição de 1:1 que foi a única que indicou potencial citotóxico com uma descida abrupta em relação aos valores das restantes diluições.

Seria de esperar uma descida gradual dos valores de viabilidade à medida que a diluição se tornava menor, porém observa-se uma descida seguida de uma subida, isto poderá ter acontecido pela presença de partículas em suspensão, ou algum erro de manipulação durante a pipetagem.

Em relação ao adesivo OP a taxa de viabilidade varia entre os 77% e os 13%. Em todas as diluições à exceção da 1:1 tem uma taxa de viabilidade superior a 70%, o que nos indica que não terá potencial citotóxico a essas concentrações. Porém quando não diluído revela também uma descida abrupta, passando para apenas 13% de viabilidade celular, o que significa que neste estado apresenta potencial citotóxico.

O Scotchbond volta a ser o adesivo associado a valores de absorvância mais baixos, com uma notória descida logo a partir da diluição de 1:50, que relembremos, apenas se colocou 4 µl de extrato em contacto com as células desta coluna. A partir desta diluição todas as outras indicaram potencial de citotoxicidade por se encontrarem abaixo dos 70% de viabilidade celular.

Para estes dados foi igualmente realizado o teste ANOVA, com um nível de significância de $p\text{-value} \leq 0,05$. O resultado foi inferior a 0,05 o que nos confirma que há uma dose-dependência, ainda que possa ser só em algumas diluições dos diferentes extratos.

E. Comparação dos resultados dos extratos não filtrados entre células 3T3 e células MG63.

Por comparação dos resultados obtidos para as células 3T3 e para as células MG63 em ensaios efetuados nas mesmas condições, ou seja, com extratos não filtrados, foi possível aferir que as células MG63 revelaram ser mais sensíveis, na maioria das situações, quando em contacto com os extratos dos diversos adesivos. Esta particularidade é bem visível nos resultados do LD50 apresentados mais à frente.

A diferença mais evidente foi para o adesivo Scotchbond numa diluição de 1:10 em que verificamos uma descida de 43% de viabilidade.

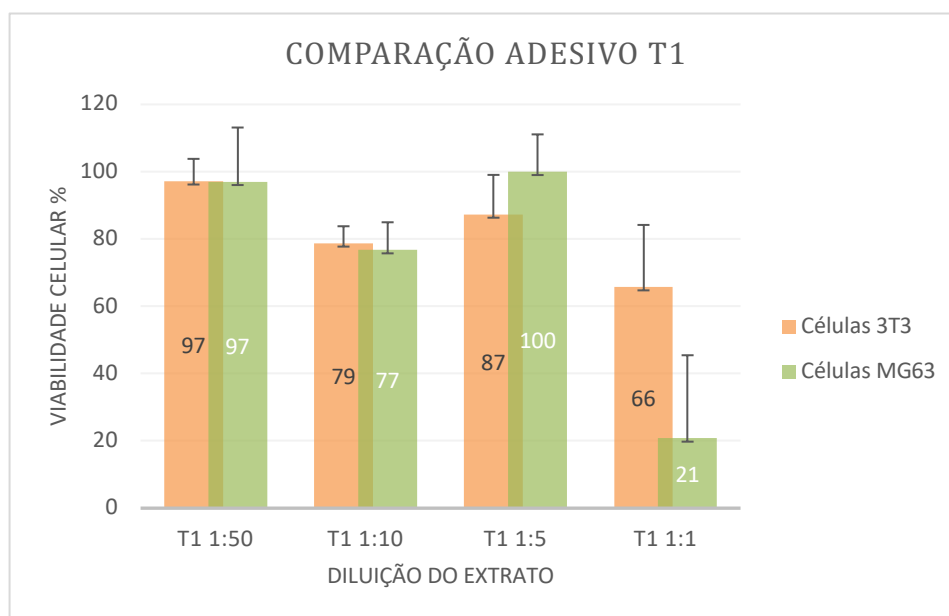


Figura 28. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 e MG63, quando expostas aos extratos não filtrados do adesivo T1.

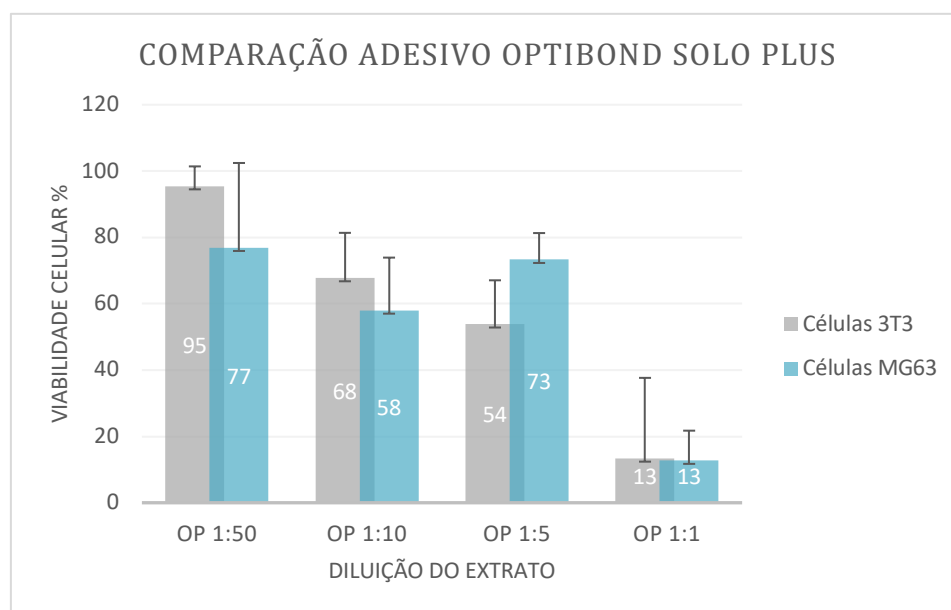


Figura 29. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 e MG63, quando expostas aos extratos não filtrados do adesivo Optibond Solo Plus.

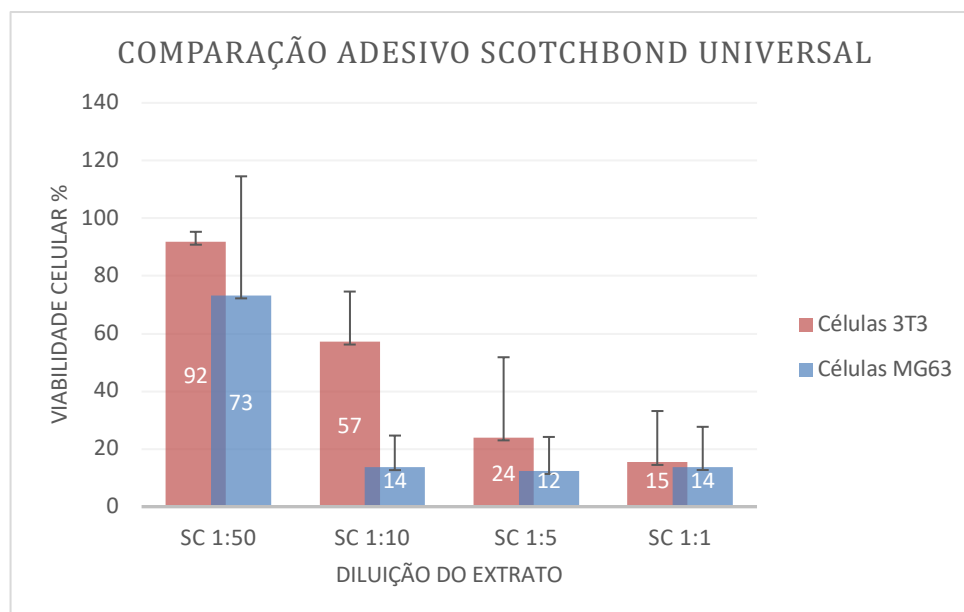


Figura 30. Comparação dos valores de viabilidade das células 3T3 e MG63, quando expostas aos extratos não filtrados do adesivo Scotchbond Universal.

Pela observação dos gráficos (figura 28, 29 e 30), o tipo de células utilizado parece ter influência sobre os resultados da viabilidade celular. Através do teste ANOVA, obteve-se resultados de $p = 0$, o que nos indica que este pressuposto é suportado estatisticamente.

Para entender realmente em que diluições esta diferença é significativa, teve que se recorrer ao teste de Turkey HSD, este fez multicomparações entre as diferentes diluições para um mesmo adesivo, sendo comparados os resultados para as 3T3 com os para as MG63. Na tabela 16 encontram-se os resultados deste teste:

Tabela 16. Resultados para o teste de *Turkey HSD* que relacionam a viabilidade celular com o tipo de célula usada no ensaio (3T3 ou MG63).

		<i>Tukey Honest Significant Difference Comparisons</i>		
		T1	Optibond Solo Plus	Scotchbond Universal
		Valores de p		
Relação entre o resultado de viabilidade celular, de um mesmo adesivo, quanto ao tipo de células	Dil. 1:1	0	1	1
	Dil. 1:5	0.167	1	0.036
	Dil. 1:10	0	0	0
	Dil. 1:50	0	0	0

Este teste indicou que, as diferenças significativas registaram-se para todas as diluições do T1. Para o Optibond Solo Plus, só as diluições de 1:1 e 1:5 é que não apresentaram diferenças significativas para as variações do tipo de célula. Por fim para o Scotchbond Universal as diferenças foram significativas à exceção de quando o extrato não foi diluído.

F. Resultados dos LD50 para os extratos dos adesivos em contacto com as células 3T3

Foi calculado o LD50 para cada adesivo, ou seja, a dose necessária para matar 50% da população, os resultados encontram-se nos gráficos abaixo (figura 31, 32 e 33).

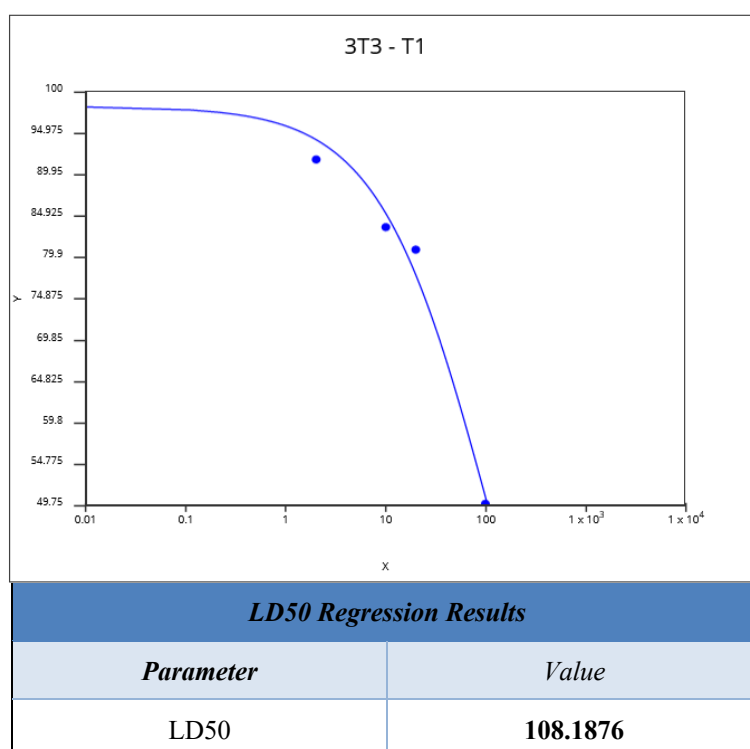


Figura 31. LD50 do adesivo T1 em contacto com células 3T3.

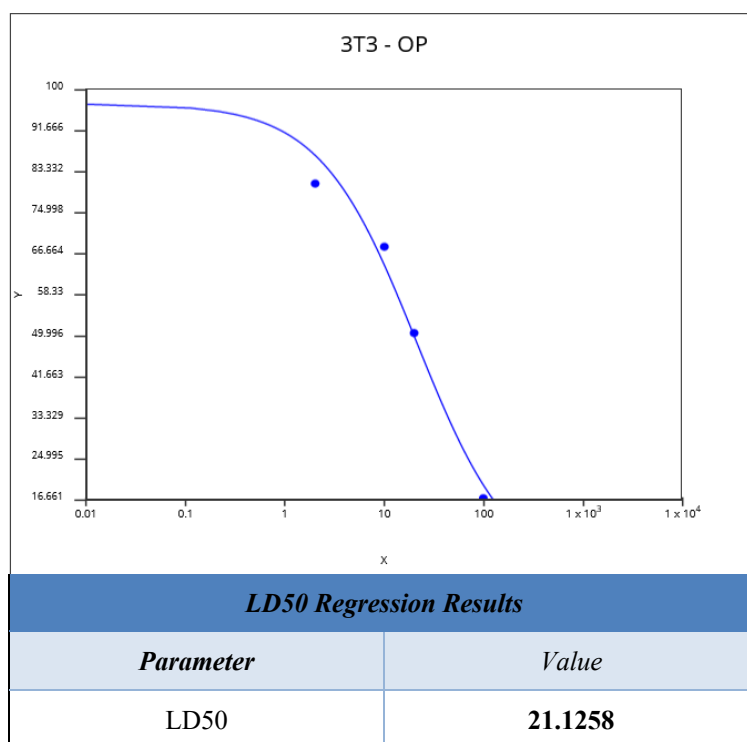


Figura 32. LD50 do adesivo Optibond Solo Plus em contacto com células 3T3.

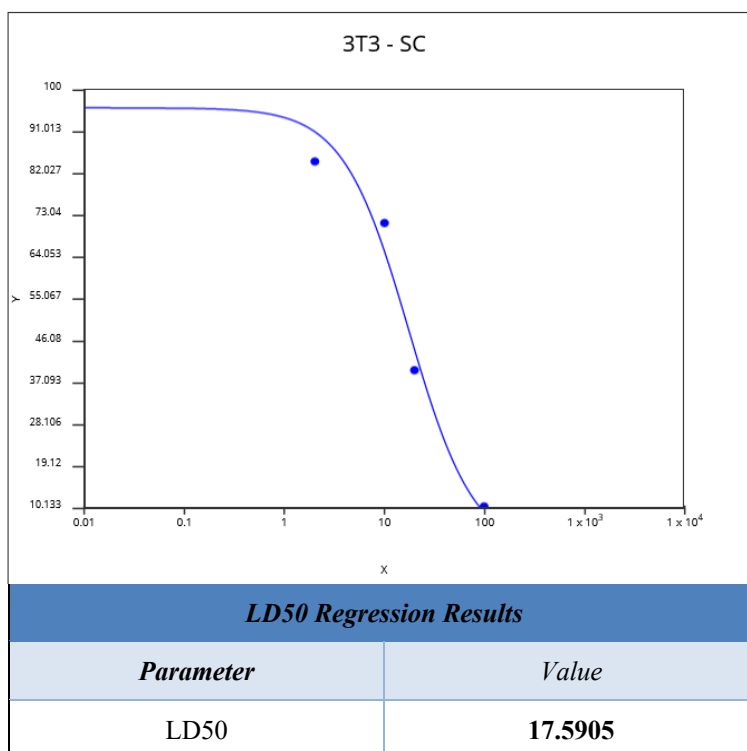


Figura 33. LD50 do adesivo Scotchbond Universal em contacto com células 3T3.

Os resultados do LD50 confirmam claramente que o adesivo T1 é o menos tóxico com um LD50 de 108.19, ou seja, com um extrato com uma diluição de 108% relativamente ao extrato mais concentrado usado neste estudo.

Tanto o Optibond Solo Plus como o Scotchbond Universal têm um LD50 muito menor, estando associados a 21,13% e 17,59% da diluição mais concentrada utilizada.

G. Resultados dos LD50 para os extratos dos adesivos em contacto com as células MG63

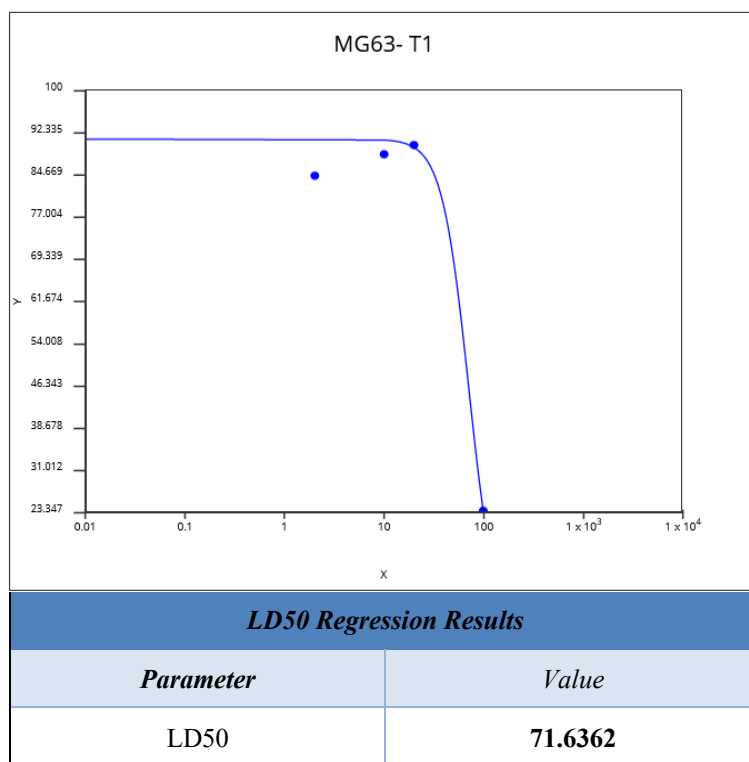


Figura 34. LD50 do adesivo T1 em contacto com as células MG63.

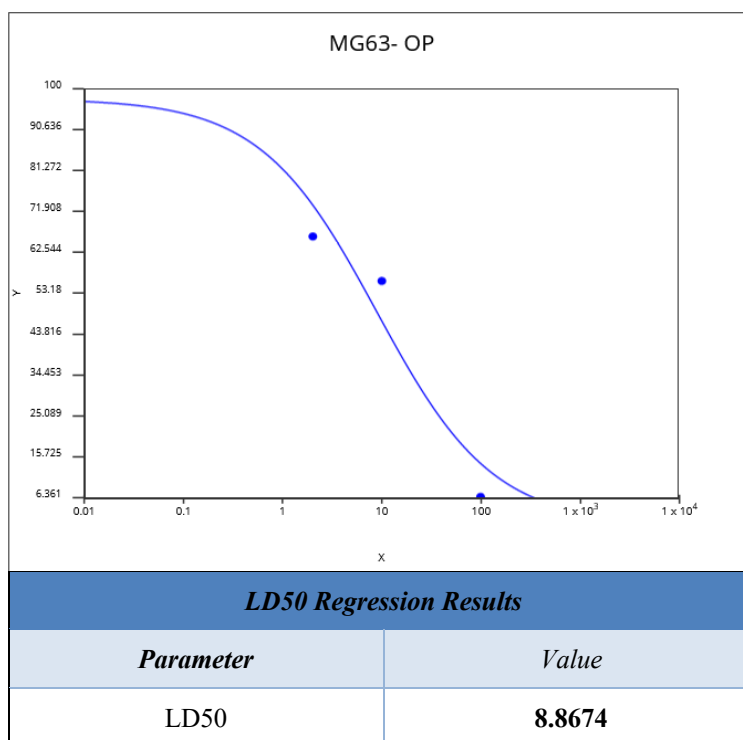


Figura 35. LD50 do adesivo Optibond Solo Plus em contacto com as células MG63.

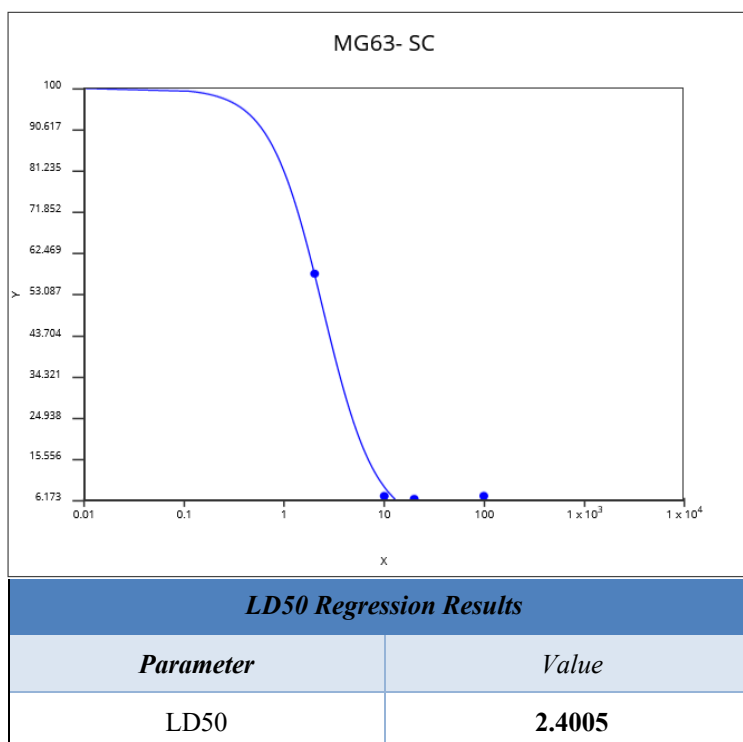


Figura 36. LD50 do adesivo Scotchbond Universal em contacto com as células MG63.

Os resultados do LD50 voltaram a confirmar que o adesivo T1 é o menos tóxico com um valor de 71.64 para células MG63.

Tanto o Optibond Solo Plus como o Scotchbond Universal têm um LD50 muito menor, sendo respectivamente, 8.88 e 2.4.

IV. DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, os adesivos dentários são vastamente utilizados na prática clínica dos Médicos Dentistas. Com a procura crescente destes materiais, presenciou-se uma simplificação nas técnicas de utilização, mas ao mesmo tempo um aumento da complexidade da sua composição. Assim, a avaliação do grau de biocompatibilidade destes materiais é um aspeto fulcral.

Sempre que surge um novo adesivo, este deve sofrer testes laboratoriais que avaliem o seu nível de citotoxicidade, de modo a entender se a aplicação deste, nos tecidos orais, é segura (Maluf et al., 2015).

Devido à padronização e reprodutividade dos ensaios feitos em cultura celulares, os testes de citotoxicidade *in vitro* são uma boa escolha para uma primeira avaliação da resposta biológica a um material (Pupo et al., 2017).

Seguindo este pressuposto, o presente trabalho aplicou o método do ensaio de MTT, sendo este simples, rápido e capaz de identificar os efeitos tóxicos dos diferentes adesivos nas células (Elias et al., 2015) embora outros tipos de ensaios sejam igualmente válidos para avaliar a citotoxicidade. Este é um método bem estabelecido e amplamente utilizado na literatura para avaliar a citotoxicidade de adesivos ou outros materiais dentários como no trabalho de Manuf et al. (2015), Lee et al. (2016), Jiang et al. (2017), Pupo et al. (2017) e Pagano et al. (2019).

Como foi explicado anteriormente, para a preparação das amostras, utilizou-se o método de extração, este é o mais utilizado, uma vez que o adesivo não entra em contacto direto com as células, reproduzindo assim o ambiente clínico.

Quanto às linhas celulares utilizadas optou-se pelas linhas celulares 3T3 e MG63. Estas linhas de células imortalizadas são preferidas para testes *in vitro* de citotoxicidade (ISO 10993-5: 2009) e têm como principal vantagem o facto de serem facilmente mantidas em cultura. Para além disto é possível eliminar a sua variabilidade individual das culturas primárias, sendo por isso mais reprodutíveis (Huang, Tai, Chou & Chang, 2002).

Embora existam bastantes estudos relativamente à citotoxicidade dos adesivos, usando igualmente o método de MTT, as comparações com os resultados do presente trabalho

são difíceis. Esta dificuldade prende-se com o facto de haver várias divergências entre os fatores dos testes aplicados.

Estas variações podem incluir, os protocolos de preparação dos materiais (adesivos), o seu tempo de fotopolimerização, o tipo de contacto com as células (direto ou indireto) ou os tipos celulares utilizados. Por exemplo, são utilizadas nos estudos células humanas gengivais primárias (Pagano et al., 2019); fibroblastos humanos do ligamento periodontal (Sun et al., 2016); células pulpares primárias (Wegehaupt, Lunghi, Belibasakis, & Attin, 2017; Massaro et al., 2019); células odontoblásticas de rato (Lee et al., 2016; Bianchi et al., 2013a; Bianchi et al., 2013b) e fibroblastos humanos pulmonares (Koulaouzidou et al., 2009).

Todas estas disparidades levam a comportamentos distintos em resposta a um mesmo material, dificultando assim a comparação entre estudos. Não obstante, várias são as investigações que sugerem um certo potencial citotóxico inerente aos sistemas adesivos, dados estes, confirmados no presente estudo.

A citotoxicidade é definida como a “capacidade das substâncias de danificar as células do tecido”. Assim, a composição da amostra desempenha um papel importante.

É de notar que a toxicidade dos sistemas adesivos observada nesta investigação resultou das diferentes composições químicas do componente adesivo, visto que apenas este frasco foi utilizado. Não foi avaliada a técnica completa, que poderia incluir o condicionamento ácido ou a etapa do *primer*.

Vários estudos afirmam que a toxicidade dos adesivos, está diretamente relacionada com o tipo e a quantidade dos monómeros libertados. Segundo um estudo de Ratanasathien, Wataha, Hanks e Dennison em 1955, entre estes monómeros encontramos, por ordem de toxicidade Bis-GMA > UDMA > TEGMA > HEMA (menos tóxico), após 24 e 72 horas de exposição.

Num estudo conduzido por Chang et al. (2010), a concentração de 0,1 mM de Bis-GMA reduziu em 50% o metabolismo de células da polpa. E num estudo de Ratanasathien e colaboradores em 1995 demonstrou que 0,00360 mM de HEMA reduziu o metabolismo celular em 50% após 24 horas de exposição.

Dois dos adesivos usados neste estudo, o Scotchbond Universal e o Optibond Solo Plus têm na sua composição dois destes monómeros, o Bis-GMA e o HEMA, podemos então especular que, o grau de citotoxicidade que obtivemos para estes materiais poderá estar em certa medida relacionado com a presença destes monómeros residuais no extrato utilizado.

Além da presença dos monómeros por si só, ainda foi relatado em estudos, nomeadamente o estudo feito por Hashieh, Cosset, Franquin e Camps (1999), que os diferentes componentes dentro dos adesivos interagem uns com os outros, o que resulta num efeito sinérgico ou antagónico em relação à citotoxicidade. Também no estudo de Tuncer e seus colaboradores (2012), foi relatado que as diferenças nas proporções de monómeros foram responsáveis pelas diferenças de citotoxicidade entre adesivos ainda que contendo componentes semelhantes.

Esta última ilação pode ser uma explicação para o facto de adesivos, apesar de conterem os mesmos monómeros, como é o caso do Scotchbond Universal e o Optibond Solo Plus, que contém Bis-GMA e HEMA, tenham diferentes níveis de citotoxicidade.

Além dos monómeros, os adesivos incluem outros componentes que também podem contribuir para a sua toxicidade. Por exemplo, no caso do Scotchbond, que se trata de um sistema adesivo universal, contem silano, tolueno, co-polímero acrílico e outros componentes que podem aumentar as suas propriedades tóxicas.

O silano, é incorporado na camada híbrida o que fará dele um componente desta mesma e consequentemente estará em contacto próximo com o complexo dentino-pulpar. Pouco se sabe relativamente aos efeitos deste composto nas células, porém poderá também contribuir o grau de toxicidade inerente.

Relativamente ao tolueno, este atua como solvente e para além de estar presente no adesivo Scotchbond também é constituinte da formulação do novo adesivo que está a ser testado na presente investigação, o T1. A toxicidade deste composto é bem conhecida o que leva a acreditar que poderá ser um dos responsáveis pelo pequeno nível de citotoxicidade que o adesivo T1 apresenta, mesmo não contendo os monómeros atrás mencionados.

Outros solventes, como é o caso do etanol, aumentam a solubilidade em água dos adesivos dentários (Malacarne et al., 2006). Assim, o aumento dessa propriedade pode permitir a

lixiviação de maiores quantidades de componentes tóxicos. Tanto o Scotchbond Universal como o Optibond Solo Plus, têm como parte dos seus constituintes etanol, o que pode constituir também um dos motivos para a toxicidade aumentada nestes dois adesivos.

No presente estudo foi possível confirmar o que já tinha sido demonstrado a nível da literatura, isto é, os sistemas adesivos utilizados diariamente na prática clínica, como é o caso do Scotchbond Universal e Optibond Solo Plus, são potencialmente citotóxicos, como tal um adesivo não deve ser aplicado diretamente no tecido pulpar, pois poderá desencadear uma reação inflamatória.

Uma das limitações deste estudo é, claramente, tratar-se de uma experiência *in vitro*, e como tal pode não refletir exatamente a situação clínica.

Na cavidade oral, os efeitos citotóxicos são influenciados por vários parâmetros. É difícil determinar em quantidade os monómeros dos adesivos dentários que são capazes de penetrar através dos túbulos dentinários até à polpa dentária ou até outros substratos. Esta lixiviação é afetada por diversas variantes, como a espessura, permeabilidade e localização da dentina, a saliva, os microrganismos presentes na cavidade oral, a área de exposição ou a presença de *smear layer* (Lee et al., 2016; Wawrzynkiewicz et al., 2020). Para além disto, no estudo *in vitro* não é tido em conta o efeito a longo prazo.

A ausência da barreira dentinária também representa uma limitação do presente estudo, dado que a sua presença reduz a difusão dos monómeros e outros constituintes dos adesivos e consequente toxicidade. Em adição, principalmente nos sistemas autocondicionantes, a dentina funciona como um tampão, sendo os monómeros acídicos gradualmente tamponados pelo conteúdo mineral do substrato dentário pelo que há uma neutralização do pH (Elias et al., 2015).

Futuros estudos *in vitro* com a presença de barreira dentinária deverão ser efetuados para perceber se há mudanças no potencial citotóxico do novo adesivo em estudo (T1).

Além destes aspetos, as linhas celulares utilizadas nesta investigação dão apenas uma primeira visão sobre os possíveis efeitos citotóxicos dos adesivos, uma vez que se trata de células de linhas secundárias. Portanto, para estudos futuros, outras células, preferencialmente linhagens de células humanas da cavidade oral, devem ser usadas para realizar estudos *in vivo*.

Os resultados, em especial para o novo adesivo, T1, deverão ser confirmados por outros métodos, para reforçar os resultados do ensaio de MTT utilizado.

Todavia, após os resultados a que se chegou, é de notar que os materiais já presentes no mercado, Scotchbon Universal e Optibond Solo Plus, apesar de serem potencialmente citotóxicos, não são por norma aplicados diretamente no tecido pulpar, sendo que mesmo em cavidades profundas é colocada uma proteção prévia (Fontes et al., 2013) o que leva a crer que em condições *in vivo*, na cavidade oral não apresentariam percentagens de viabilidade celular tão baixas.

Não obstante, ainda que necessitando mais testes que corroborem estes resultados, o adesivo T1 revelou-se como promissor, por apresentar taxas de viabilidade muito superiores aos restantes adesivos em teste, facto que poderá ter a ver com a sua formulação e ausência de monómeros.

V. CONCLUSÕES

Perante os diversos resultados obtidos na presente investigação, e tendo em conta as limitações associadas a esta, podemos aceitar a hipótese alternativa: há diferenças na viabilidade celular quando em contacto com os diferentes adesivos. A hipótese nula foi rejeitada. Com este estudo é possível fazer algumas considerações:

- Os fibroblastos de rato da linha celular 3T3, são sensíveis aos adesivos testados em todas as concentrações, quando não filtrados, sugerindo os resultados a seguinte ordem de citotoxicidade: T1 < Optibond Solo Plus < Scotchbond Universal;
- Os fibroblastos de rato da linha celular 3T3, são sensíveis aos adesivos testados em todas as concentrações, quando filtrados, sugerindo os resultados a seguinte ordem de citotoxicidade: T1 < Scotchbond Universal < Optibond Solo Plus;
- Os osteoblastos da linha celular MG63, são sensíveis aos adesivos não filtrados, testados em todas as concentrações, sugerindo os resultados da seguinte ordem de citotoxicidade: T1 < Optibond Solo Plus < Scotchbond Universal;
- Os três adesivos apresentam um efeito dose-dependente, isto é, quanto maior a concentração de extrato do adesivo em contacto com as células, maior o seu poder citotóxico;
- Quando os extratos dos adesivos são filtrados, há diferenças na viabilidade celular, sendo que por norma há um aumento da viabilidade quando há filtração.
- As células 3T3 e as MG63 reagem de forma diferente a um mesmo tóxico.
- De um modo geral as células MG63 parecem ser mais sensíveis aos tóxicos.

Uma vez que o adesivo T1 parece ter tido um resultado superior nos testes de viabilidade celular, quando comparado com os restantes adesivos em estudo, e tendo em conta que este ainda se encontra em fase experimental, devem continuar a ser realizados estudos que corroborem estes resultados e avaliem também a sua resistência adesiva, modo de aplicação, contração de polimerização entre outros aspetos importantes na prática clínica.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alex, G. (2015). Universal adhesives: the next evolution in adhesive dentistry. *Compend Contin Educ Dent*, 36(1), 15-26.
- Anusavice, K. J., Shen, C. & Rawls R. (2013a). Phillips' science of dental materials (12a ed., pp. 3-16). Elsevier Saunders.
- Anusavice, K. J., Shen, C. & Rawls R. (2013b). Phillips' science of dental materials (12a ed., pp. 17-29). Elsevier Saunders.
- Anusavice, K. J., Shen, C. & Rawls, R. (2013c). Phillips' science of dental materials (12a ed., pp. 259-267). Elsevier Saunders.
- Arinelli, A. M. D., Pereira, K. F., Prado, N. A. S., & Rabello, T. B. (2016). Sistemas adesivos atuais. *Revista Brasileira de Odontologia*, 73(3), 242.
- AAT Bioquest, Inc. (2020, Outubro 24). Recuperado: Outubro, 26, 2020 de <https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>.
- ATCC. (2020, Fevereiro 10). Recuperado: Outubro, 26, 2020 de [http:// www.atcc.org](http://www.atcc.org).
- Azevedo, R. B., Faber, J., Leal, S., & Lucci, C. (2016). Histologia da cavidade oral. *Sistema digestório: integração básico-clínica. Blucher*, 215-226.
- Bath-Balog, M., & Fehrenbach, M. (2012). Anatomia, Histologia e Embriologia dos Dentes e das Estruturas Orofaciais (3ª Edição, p. 156). Elsevier.
- Beltrami, R., Chiesa, M., Scribante, A., Allegretti, J., & Poggio, C. (2016). Comparison of shear bond strength of universal adhesives on etched and nonetched enamel. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 14(1), 78-83.
- Berkovitz, B. K., Holland, G. R., & Moxham, B. J. (2017). *Oral Anatomy, Histology and Embryology E-Book*. (pp. 105-168). Elsevier Health Sciences.
- Bianchi, L., Ribeiro, A. P. D., de Oliveira Carrilho, M. R., Pashley, D. H., de Souza Costa, C. A., & Hebling, J. (2013). Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101(8), 1498-1507.

- Borenfreund, E., Babich, H., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro*, 2(1), 1-6.
- Breschi, L., Ferracane, J., Cadenaro, M., Mazzoni, A., & Hilton, T. (2013). Adhesion to Enamel and Dentin. In T. Hilton, J. Ferracane, & J. Broome, *Summitt's Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (pp. 207- 238). Quintessence Publishing Company.
- Carvalho, R. M., Manso, A. P., Geraldeli, S., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2012). Durability of Bonds and Clinical Success of Adhesive Restorations. *Dental Materials*, 28(1), 72-86. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2011.09.011>.
- Chang, H. H., Chang, M. C., Lin, L. D., Lee, J. J., Wang, T. M., Huang, C. H., Ting-Ting, H., Lin, H., & Jeng, J. H. (2010). The mechanisms of cytotoxicity of urethane dimethacrylate to Chinese hamster ovary cells. *Biomaterials*, 31(27), 6917-6925.
- Chang, H. H., Chang, M. C., Wang, H. H., Huang, G. F., Lee, Y. L., Wang, Y. L., Chan, C., Yeung, S., Tseng, S., & Jeng, J. H. (2014). Urethane dimethacrylate induces cytotoxicity and regulates cyclooxygenase-2, hemeoxygenase and carboxylesterase expression in human dental pulp cells. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.006>
- Chang, M. C., Chen, L. I., Chan, C. P., Lee, J. J., Wang, T. M., Yang, T. T., Lin, P., Lin, H., Chang, H., & Jeng, J. H. (2010). The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials*, 31(32), 8164-8171.
- Chang, M. C., Lin, L. D., Wu, M. T., Chan, C. P., Chang, H. H., Lee, M. S., Sun, T., Jeng, P., Yeung, S., Lin, H., & Jeng, J. H. (2015). Effects of camphorquinone on cytotoxicity, cell cycle regulation and prostaglandin E2 production of dental pulp cells: role of ROS, ATM/Chk2, MEK/ERK and hemeoxygenase-1. *PLoS One*, 10(12), e0143663.
- Coelho, A., Canta, J. P., Martins, J. N., Oliveira, S. A., & Marques, P. (2012). Perspetiva histórica e conceitos atuais dos sistemas adesivos amelodentinários—revisão da literatura. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 53(1), 39-46.

Delbons, F. B., Perdigão, J., Araujo, E., Freire, C. A. M., Caldas, D. D., Cardoso, J. L., Pagani, M., Borges, G. A., & Lima, R. B. (2015). Randomized clinical trial of four adhesion strategies in posterior restorations - 18-month results. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 27(2), 107–117. <http://doi.org/10.1111/jerd.12135>.

Elias, S. T., Santos, A. F. D., Garcia, F. C., Pereira, P. N., Hilgert, L. A., Fonseca-Bazzo, Y. M., Guerra, E., N., S., & Ribeiro, A. P. D. (2015). Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. *Brazilian Dental Journal*, 26(2), 160-168.

Falconi, M., Teti, G., Zago, M., Pelotti, S., Breschi, L., & Mazzotti, G. (2007). Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell biology and toxicology*, 23(5), 313-322.

Fontes, S. T., Fernández, M. R., Ogliari, F. A., de Carvalho, R. V., de Moraes, R. R., Pinto, M. B., & Piva, E. (2013). Tetrahydrofuran as solvent in dental adhesives: cytotoxicity and dentin bond stability. *Clinical oral investigations*, 17(1), 237-242.

Fruits, T. J., Khajotia, S. S., & Nicholson, J. W. (2013). Biologic considerations. In T. J. Hilton, J. L. Ferracane, & J. C. Broome, *Summitt's Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (4th Edition ed., pp. 1-36). Quintessence books.

Gentile, F., Medda, R., Cheng, L., Battista, E., Scopelliti, P. E., Milani, P., Adam, E., A., C., & Decuzzi, P. (2013). Selective modulation of cell response on engineered fractal silicon substrates. *Scientific reports*, 3(1), 1-10.

Giannini, M., Makishi, P., Ayres, A. P. A., Vermelho, P. M., Fronza, B. M., Nikaido, T., & Tagami, J. (2015). Self-etch adhesive systems: a literature review. *Brazilian dental journal*, 26(1), 3-10. <http://doi.org/10.1590/0103-6440201302442>

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.

Hashieh, A., I., Cosset, A., Franquin, J. C., & Camps, J. (1999). In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *Journal of endodontics*, 25(2), 89-92.

Huang, F. M., Tai, K. W., Chou, M. Y., & Chang, Y. C. (2002). Cytotoxicity of resin-, zinc oxide–eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human

periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *International Endodontic Journal*, 35(2), 153-158.

International Organization for Standardization (ISO). (2012). ISO 10993-12: 2012. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 12: Sample Preparation and Reference Materials.

International Organization for Standardization (ISO). (2009). ISO 10993-5: 2009. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Test for in vitro cytotoxicity.

Jiang, R. D., Lin, H., Zheng, G., Zhang, X. M., Du, Q., & Yang, M. (2017). In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *Journal of dentistry*, 58, 28-33.

Kierklo, A., Pawińska, M., Tokajuk, G., Popławska, B., & Bielawska, A. (2012). Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, ex vivo. *Advances in medical sciences*, 57(2), 385-390.

Knetsch, M. L. (2013). Evolution of current and future concept of biocompatibility testing. S. Dumitriu, & V. Popa, *Polymeric Biomaterials-Structure and Function*, (Third ed., Vol. 1, pp. 377-415). Taylor & Francis.

Koulaouzidou, E. A., Helvatjoglou-Antoniades, M., Palaghias, G., Karanika-Kouma, A., & Antoniades, D. (2009). Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *European journal of dentistry*, 3(1), 3.

Lacruz, R. S., Habelitz, S., Wright, J. T., & Paine, M. L. (2017). Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiological Reviews*, 97(3), 939-993.

Lee, Y., An, S. Y., Park, Y. J., Yu, F. H., Park, J. C., & Seo, D. G. (2016). Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line. *Scanning*, 38(1), 36-42.

Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi L., Mazzoni, A., Li, N., Mao, J., Pashley, D.H., & Tay, F. R. (2011). Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of dental research*, 90(8), 953-968.

Loguercio, A. D., Muñoz, M. A., Luque-Martinez, I., Hass, V., Reis, A., & Perdigão, J. (2015). Does active application of universal adhesives to enamel in self-etch mode

improve their performance?. *Journal of dentistry*, 43(9), 1060-1070.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.04.005>

MacDougall, M., Selden, J. K., Nydegger, J. R., & Carnes, D. L. (1998). Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *American journal of dentistry*, 11, S11-6.

Malacarne, J., Carvalho, R. M., Mario, F., Svizero, N., Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C., K., & de Carrilho, M. R. O. (2006). Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental Materials*, 22(10), 973-980.

Maluf, D. F., Freitas, F. F., Cintia, F. D. F., Camila, N. D. M., & Pupo, Y. M. (2015). Avaliação da citotoxicidade de sistemas adesivos convencionais com diferentes protocolos de aplicação clínica. *Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde*, 2(11), 21-29.

Marovic, D., Tadin, A., Mladinic, M., Juric-Kacunic, D., & Galic, N. (2014). In vitro detection of DNA damage in human leukocytes induced by combined effect of resin composites and adhesive systems. *American journal of dentistry*, 27(1), 35.

Massaro, H., Zambelli, L. F., Britto, A. A. D., Vieira, R. P., Ligeiro-de-Oliveira, A. P., Andia, D. C., Oliveira, M., T., & Lima, A. F. (2019). Solvent and hema increase adhesive toxicity and cytokine release from dental pulp cells. *Materials*, 12(17), 2750.

Moharamzadeh, K., Brook, I. M., & Noort, R. V. (2009). Biocompatibility of resin- based dental materials. *Materials*, 2, 514-548. <https://doi.org/10.2174/156802608783790901>.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Muñoz, M. A., Luque, I., Hass, V., Reis, A., Loguercio, A. D., & Bombarda, N. H. C. (2013). Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *Journal of dentistry*, 41(5), 404-411.

Muñoz, M. A., Luque-Martinez, I., Malaquias, P., Hass, V., Reis, A., Campanha, N. H., & Loguercio, A. D. (2015). In vitro longevity of bonding properties of universal adhesives to dentin. *Operative Dentistry*, 40(3), 282-292. <http://doi.org/10.2341/14-055-L>.

- Nanci, A. (2013). Enamel: composition, formation, and structure; Dentin-pulp complex. In A. Nanci, Ten Cate's. Oral histology: development, structure, and function (8th ed., pp. 122-204). Elsevier Mosby.
- Narvekar, A. S. A., & Ramamoorthi, M. (2015). Cytotoxic effects of restorative biomaterials on dental pulp—a systematized review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 239-266.
- Pagano, S., Lombardo, G., Balloni, S., Bodo, M., Cianetti, S., Barbati, A., Montaseri, A., & Marinucci, L. (2019). Cytotoxicity of universal dental adhesive systems: Assessment in vitro assays on human gingival fibroblasts. *Toxicology In Vitro*, 60, 252-260.
- Papadogiannis, D., Dimitriadi, M., Zafiropoulou, M., Gaintantzopoulou, M. D., & Eliades, G. (2019). Universal adhesives: setting characteristics and reactivity with dentin. *Materials*, 12(10): 1-16. <https://doi.org/10.3390/ma12101720>.
- Perdigão, J., Kose, C., Mena-Serrano, A. P., De Paula, E. A., Tay, L. Y., Reis, A. L. A. D., & Loguercio, A. D. (2014). A new universal simplified adhesive: 18-month clinical evaluation. *Operative dentistry*, 39(2), 113-127.
- Perdigão, J., Swift, E. J., & Walter, R. (2014). Fundamental Concepts of Enamel and Dentin Adhesion. In H. O. Heymann, E. J. Jr Swift, & A. V. Ritter (Eds.), *Studivant's Art and Science of Perative Dentistry* (6th Editio, pp. 114–140). Elsevier Mosby.
- Prica, D., Tadin, A., Marović, D., Katunarić, M., Prica, A., & Galić, N. (2013). Effects of dental adhesives on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes in vitro. *Acta clinica Croatica*, 52(3.), 309-315.
- Pupo, Y. M., Bernardo, C. F. D. F., de Souza, F. F. D. F. A., Michél, M. D., Ribeiro, C. N. D. M., Germano, S., & Maluf, D. F. (2017). Cytotoxicity of etch-and-rinse, self-etch, and universal dental adhesive systems in fibroblast cell line 3T3. *Scanning*, 2017.
- Qamar, Z., Rahim, Z. B. H. A., Chew, H. P., & Fatima, T. (2017). Influence of trace elements on dental enamel properties: A review. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(1), 116-20.

- Ratanasathien, S., Wataha, J. C., Hanks, C. T., & Dennison, J. B. (1995). Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 74(9), 1602-1606.
- Ritter, A. V., Boushell, L. W., Walter, R., (2017). *Sturdevant's art & science of operative dentistry-e-book*. (7th Ed. pp. 296-346) Elsevier Health Sciences.
- Rodrigues, S. C. V. (2011). Preparation of collagen-hydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for tissue engineering applications.
- Rosa, W. L. D. O., Piva, E., & Silva, A. F. (2015). Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*, 43(7), 765-776.
- Sai, K., Takamizawa, T., Imai, A., Tsujimoto, A., Ishii, R., Barkmeier, W. W., Latta, M., A., & Miyazaki, M. (2018). Influence of Application Time and Etching Mode of Universal Adhesives on Enamel Adhesion. *Journal of Adhesive Dentistry*, 20(1): 65-77. <http://doi.org/10.3290/j.jad.a39913>.
- Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D. (2009). *Biocompatibility of dental materials* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1007/978-3-540-77782-3>.
- Sezinando, A. (2014). Looking for the ideal adhesive—a review. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 55(4), 194-206. <http://doi.org/10.1016/j.rpemd.2014.07.004>.
- Sezinando, A., Luque-Martinez, I., Muñoz, M. A., Reis, A., Loguercio, A. D., & Perdigão, J. (2015). Influence of a hydrophobic resin coating on the immediate and 6-month dentin bonding of three universal adhesives. *Dental Materials*, 31(10), e236-e246. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.07.002>.
- 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. *Toxicology mechanisms and methods*, 29(5), 368-377.
- Shibata, S., Vieira, L. C. C., Baratieri, L. N., Fu, J., Hoshika, S., Matsuda, Y., & Sano, H. (2016). Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. *Dental Materials Journal*, 35(2), 166-173. <http://doi.org/10.4012/dmj.2014-330>.

- Silva, J. M., Rodrigues, J. R., Camargo, C. H., Fernandes, V. V. B., Hiller, K. A., Schweikl, H., & Schmalz, G. (2014). Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives. *Clinical Oral Investigations*, 18(2), 607-613
- Spencer, P., Ye, Q., Misra, A., Goncalves, S. D. P., & Laurence, J. S. (2014). Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *Journal of dental research*, 93(12), 1243-1249.
- Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., Romeo, U., & Migliau, G. (2017). Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Annali di stomatologia*, 8(1), 1.
- Sousa, J. H. P. D., & Moro, A. F. V. (2014). Primer Solvents: literature review. *Revista Brasileira de Odontologia*, 71(1), 80-84
- Sun, F., Mao, P., Wang, C., Shi, C., Nie, R., Han, N., & Han, X. (2016). Cytotoxic effects of one-step self-etching dental adhesives on human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Adhes Dent*, 18(2), 99-109.
- Tadin, A., Galic, N., Zeljezic, D., Vitasovic, B. M., Marovic, D., & Kovacic, I. (2013). Ex vivo evaluation of genotoxic effects of four dental adhesives on human leukocytes. *Journal of Dental Sciences*, 8(1), 37-43
- Tadin, A., Gavić, L., & Galić, N. (2016). Biocompatibility of dental adhesives. In *Adhesives-Applications and Properties*. InTech. <http://doi.org/10.5772/64943>.
- Takamizawa, T., Barkmeier, W. W., Tsujimoto, A., Scheidel, D. D., Erickson, R. L., Latta, M. A., & Miyazaki, M. (2015). Effect of phosphoric acid pre-etching on fatigue limits of self-etching adhesives. *Operative dentistry*, 40(4), 379-395.
- Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K. A., & Schweikl, H. (2002). Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*, 18(4), 318-323.
- Tuncer, S., Demirci, M., Schweikl, H., Erguven, M., Bilir, A., & Tuncer, A. K. (2012). Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clinical oral investigations*, 16(6), 1635-1646.

- Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (2003). Buonocore Memorial Lecture. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Operative dentistry*, 28(3), 215.
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, De Munck, J., & Van Landuyt, K. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental materials*, 27(1), 17-28.
- Zecin-Deren, A., Lukomska-Szymanska, M., Szczesio-Wlodarczyk, A., Piwonski, I., Sokolowski, J., & Lapinska, B. (2020). The Influence of Application Protocol of Simplified and Universal Adhesives on the Dentin Bonding Performance. *Applied Sciences*, 10(1), 124.
- Wagner, A., Wendler, M., Petschelt, A., Belli, R., & Lohbauer, U. (2014). Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *Journal of dentistry*, 42(7), 800-807.
- Wang, X., Xia, Y., Liu, L., Liu, M., Gu, N., Guang, H., & Zhang, F. (2010). Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 95(2), 357-364.
- Wawrzynkiewicz, A., Rozpedek-Kaminska, W., Galita, G., Lukomska-Szymanska, M., Lapinska, B., Sokolowski, J., & Majsterek, I. (2020). The Cytotoxicity and Genotoxicity of Three Dental Universal Adhesives—An In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3950.
- Wegehaupt, F. J., Lunghi, N., Belibasakis, G. N., & Attin, T. (2017). Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. *BMC oral health*, 17(1), 12.