



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**BIOCOMPATIBILIDADE DE RESINAS BULK FILL**

Trabalho submetido por  
**Carla Bertolini Frigori Junqueira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**setembro de 2022**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**BIOCOMPATIBILIDADE DE RESINAS BULK FILL**

Trabalho submetido por  
**Carla Bertolini Frigori Junqueira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Profª Doutora Isabel Barahona**

**setembro de 2022**



## **Dedicatória**

Aos meus três filhos, Maurício, Marcelo e Murilo, que são a razão da minha  
existência e meus amores além da vida.

Ao meu esposo Olavo, por todo amor, companheirismo e por ter aceitado  
embarcar neste sonho comigo.

E a Deus, por sempre me guiar, iluminar o meu caminho e por ter me  
dado a oportunidade de chegar até aqui.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em especial à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Doutora Isabel Barahona, pelos grandiosos ensinamentos, convivência, auxílio em todos os momentos e principalmente pela oportunidade de crescimento, aprendizado contínuo, realização profissional e pessoal e confiança em mim depositada.

A todos os professores do Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário Egas Moniz, que ao longo do curso me ensinaram e motivaram para ser sempre melhor.

A todos os colegas de Curso, em especial a Syrine Gargouri, pela amizade, convivência e auxílio nos atendimentos aos pacientes durante as consultas na clínica dentária.

Aos meus pais, Cláudia e Emílio, por todas as oportunidades e apoio que me deram ao longo da vida. E ao meu irmão, Rafael, pela amizade e companheirismo.

A todos os funcionários do Instituto Universitário Egas Moniz, pela dedicação e eficiência.







## RESUMO

**Introdução:** recentemente surgiram as resinas compostas Bulk fill, que foram desenvolvidas para facilitar e agilizar o procedimento restaurador, pois permitem sua inserção em camadas de 4-6 mm. Entretanto, dados científicos quanto à sua biocompatibilidade ainda são limitados.

**Objetivos:** avaliar a genotoxicidade dos extratos de três diferentes resinas Bulk fill: Filtek One Bulk fill, Coltene Fill-Up! e Tetric EvoCeram Bulk fill.

**Materiais e Métodos:** a genotoxicidade foi avaliada realizando o Ensaio dos Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN). Utilizamos uma linha celular bem caracterizada e muito usada para este ensaio: células 3T3 de fibroblastos embrionários de ratinho. Os extratos foram obtidos por incubação dos cilindros de resina (confeccionados conforme o fabricante) em meio de cultura durante 24h a 37°C em atmosfera húmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a realização do teste de CBMN, as células foram expostas a diferentes concentrações dos extratos das três resinas. A presença de micronúcleos foi determinada por visualização ao microscópio ótico.

**Resultados:** A Filtek One Bulk fill demonstrou índices de genotoxicidade 2 a 5 vezes superiores ao controlo negativo e durante a fotopolimerização apresentou polimerização completa e consistência firme, sugerindo alto grau de conversão (DC). As resinas Tetric EvoCeram Bulk fill e Coltene Fill-Up!, apresentaram índices de genotoxicidade 3 a 8 vezes superiores e 4 a 15 vezes superiores ao controlo negativo, respetivamente. Durante a fotopolimerização foi observada consistência média e pastosa nas resinas Tetric EvoCeram Bulk fill e Coltene Fill-Up!, respetivamente; sugerindo uma polimerização incompleta em ambas as resinas.

**Conclusões:** a resina que induziu mais efeitos genotóxicos foi a Coltene Fill-Up! seguida pela Tetric EvoCeram Bulk fill. A Filtek One Bulk fill foi a que apresentou menor genotoxicidade nas concentrações dos extratos testados, demonstrando ser mais segura para usos clínicos prolongados.

**Palavras-Chave:** biocompatibilidade, resinas Bulk fill, Ensaio dos Micronúcleos com bloqueio da citocinese, genotoxicidade.



## ABSTRACT

**Introduction:** Bulk fill composite resins have recently appeared, which were developed to facilitate and speed up the restorative procedure, as they allow their insertion in layers of 4-6 mm. However, scientific data regarding its biocompatibility are still limited.

**Objectives:** to evaluate the genotoxicity of extracts from three different Bulk fill resins: Filtek One Bulk fill, Coltene Fill-Up! and Tetric EvoCeram Bulk fill.

**Materials and Methods:** genotoxicity was evaluated by performing the Cytokinesis Blockade Micronucleus Assay (CBMN). We used a well-characterized and widely used cell line for this assay: mouse embryonic fibroblast 3T3 cells. The extracts were obtained by incubating the resin cylinders (made according to the manufacturer) in culture medium for 24h at 37°C in a humid atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>. To perform the CBMN test, the cells were exposed to different concentrations of extracts from the three resins. The presence of micronuclei was determined by visualization under an optical microscope.

**Results:** Filtek One Bulk fill showed genotoxicity rates 2 to 5 times higher than the negative control and during light curing it showed complete polymerization and firm consistency, suggesting a high degree of conversion (DC). Tetric EvoCeram Bulk fill and Coltene Fill-Up! resins showed genotoxicity rates 3 to 8 times higher and 4 to 15 times higher than the negative control, respectively. During light curing, medium and pasty consistency was observed in Tetric EvoCeram Bulk fill and Coltene Fill-Up! resins, respectively; suggesting incomplete polymerization in both resins.

**Conclusions:** the resin that induced the most genotoxic effects was Coltene Fill-Up! followed by Tetric EvoCeram Bulk fill. Filtek One Bulk fill was the one that showed the lowest genotoxicity in the concentrations of the extracts tested, proving to be safer for prolonged clinical uses.

**Keywords:** biocompatibility, Bulk fill resins, Micronucleus Assay with cytokinesis blockade, genotoxicity.



## ÍNDICE GERAL

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	5
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	9
<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	11
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	13
1 - Resinas Compostas.....	13
1.1 - Resinas Bulk fill.....	14
2 - Biocompatibilidade em Materiais Dentários.....	15
3 - Citotoxicidade.....	17
3.1 - Ensaio do MTT.....	18
3.2 - Ensaio do Cristal Violeta .....	18
4 - Genotoxicidade.....	19
4.1 - Ensaio dos Micronúcleos (MN).....	20
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
1 - Materiais .....	25
1.1 - Resinas Compostas Bulk fill .....	25
1.1.1 - Análise comparativa das resinas compostas utilizadas.....	27
1.2 - Linha Celular .....	27
1.3 - Reagentes .....	29
2 - Métodos.....	30
2.1 - Preparação das Culturas de Células .....	30
2.2 - Preparação dos Cilindros de Resinas.....	32
2.3 - Ensaio dos Micronúcleos .....	34
<b>4 – RESULTADOS</b> .....	37
1 - Polimerização das Resinas.....	37

2 - Genotoxicidade.....	38
2.1 - Ensaio dos Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN).....	38
2.1.1 - Diferentes Formatos de MN em células Binucleadas.....	42
2.2 - Cálculos de Proliferação Celular e Frequência de Micronúcleos.....	43
2.2.1 - Índice de Proliferação de células com bloqueio da citocinese (Cytokinesis-Block Proliferation Index – CBPI) ou Índice de Não Divisão (NDI).....	43
2.2.2 - Percentagem de células BiNucleadas (%BN) .....	44
2.2.3 - MicroNúcleos em células BiNucleadas (%MNBN) .....	45
<b>5 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>7 - BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Apresentação comercial da resina Filtek One Bulk fill.....	25
<b>Figura 2</b> - Apresentação comercial da resina Tetric EvoCeram Bulk fill.....	26
<b>Figura 3</b> - Apresentação comercial da resina Coltene Fill-Up!.....	26
<b>Figura 4</b> - Células 3T3 Aderentes, microscópio ótico invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA) (Ampliação 400x em contraste de fase).....	28
<b>Figura 5</b> - Células 3T3 armazenadas em criotubos a -140°C.....	30
<b>Figura 6</b> - Câmara de Neubauer.....	32
<b>Figura 7</b> - Células 3T3 presentes numa câmara de Neubauer, microscópio ótico invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA), (Ampliação de 100x).....	32
<b>Figura 8</b> - Confeção dos cilindros das diferentes resinas compostas.....	33
<b>Figura 9</b> - Molde Metálico utilizado na confeção dos cilindros das diferentes resinas compostas.....	33
<b>Figura 10</b> - Cultura celular 3T3, após 24hs de incubação com diferentes concentrações de genotóxicos.....	35
<b>Figura 11</b> - Lâminas confeccionadas a partir dos diferentes extratos das Resinas Bulk fill.....	36
<b>Figura 12</b> - Consistência dos cilindros das três diferentes resinas Bulk fill após a polimerização.....	37
<b>Figura 13</b> - Células 3T3 Mononucleadas com ou sem MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).....	39
<b>Figura 14</b> - Células 3T3 Binucleadas com ou sem MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).....	39
<b>Figura 15</b> - Células 3T3 Trinucleadas com ou sem MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).....	39
<b>Figura 16</b> - Células 3T3 Binucleadas com vários MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).....	39
<b>Figura 17</b> - Células 3T3 Binucleadas com diferentes formas de MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).....	42
<b>Figura 18</b> - Cálculo do Índice de Proliferação de células com bloqueio da citocinese (CBPI).....	44
<b>Figura 19</b> - Cálculo da Percentagem de Células Binucleadas (%BN).....	45
<b>Figura 20</b> - Cálculo dos Micronúcleos em células binucleadas (MNBN%).....	46



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características das Resinas compostas Bulk fill testadas.....	27
<b>Tabela 2</b> - Lista de Reagentes.....	29
<b>Tabela 3</b> - Preparação das diferentes concentrações dos extratos das três Resinas Bulk fill.....	34
<b>Tabela 4</b> - Resultado da polimerização das diferentes resinas Bulk fill.....	37
<b>Tabela 5</b> - Contagem celular dos controlos negativos e controlos positivos dos três Ensaio realizados em simultâneo com células expostas a diferentes concentrações das três Resinas Bulk fill.....	38
<b>Tabela 6</b> - Contagem celular do Ensaio dos CBMN, realizado com a Resina Filtek One Bulk fill.....	40
<b>Tabela 7</b> - Contagem celular do Ensaio dos CBMN, realizado com a Resina Tetric EvoCeram Bulk fill.....	40
<b>Tabela 8</b> - Contagem celular do Ensaio dos CBMN, realizado com a Resina Coltene Fill-Up! .....	41



## LISTA DE SIGLAS

AFM	Monómeros de fragmentação adicional, do inglês – <i>Additional fragmentation monomer</i>
AUDMA	Uretano dimetacrilato aromático, do inglês - <i>Aromatic dimethacrylate Urethane</i>
BisGMA	Bisfenol Metacrilato de Glicidila, do inglês - <i>Bisphenol A-diglycidyl Dimethacrylate</i>
BMN	Micronúcleos em Células Bucais, do inglês - <i>Buccal Micronucleus</i>
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CBMN	Micronúcleos por Bloqueio da Citocinese, do inglês - <i>Cytokinesis-block Micronucleus</i>
CBPI	Índice de Proliferação de células com bloqueio da citocinese, do inglês - <i>Cytokinesis-Block Proliferation Index</i>
CV	Cristal Violeta
DC	Grau de conversão, do inglês - <i>Degree of conversion</i>
DDDMA	Dodecano dimetacrilato, do inglês – <i>Dodecane dimethacrylate</i>
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população testada
DMEM	Meio de Eagle Modificado de Dulbecco, do inglês - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido, do inglês - <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês - <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EMN	Micronúcleos em Eritrócitos, do inglês - <i>Erythrocyte Micronucleus</i>
HEMA	Hidroxietil Metacrilato, do inglês - <i>2-hydroxyethyl methacrylate</i>
hs	Horas
HUMN	Micronúcleos Humanos (HUMN), do inglês - <i>Human Micronucleus</i>
ISO	Organização Internacional para Padronização, do inglês - <i>International Organization for Standardization</i>
LED	Diodo Emissor de Luz, do inglês - <i>Light Emitting Diode</i>
mg/ml	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mm	Milímetro

mM	Milimolares
MN	Micronúcleos
MO	Microscópio Óptico Invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA)
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, do inglês - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatts por centímetro quadrado
NDI	Índice de Não Divisão
nm	Nanómetros
OD	Densidade ótica
PBS	Tampão fosfato, do inglês - <i>Phosphate-buffered saline</i>
PNA	Solução de Piruvato de Sódio, do inglês - <i>Sodium pyruvate solution</i>
rpm	Rotações por minuto
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato, do inglês – <i>Triethylene glycol Dimethacrylate</i>
T25	Frasco de cultura celular de 25 cm <sup>2</sup>
UDMA	Uretano Dimetacrilato, do inglês - <i>Urethane dimethacrylate</i>
UV	Luz ultravioleta
U/ml	Unidades por mililitro
µg/ml	Microgramas por mililitro
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
3T3	Células NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)
°C	Graus centígrados
%BN	Porcentagem de células BiNucleadas
%MNBN	Incidência de Micronúcleos em mil células BiNucleadas

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1 - Resinas Compostas

As resinas compostas convencionais foram introduzidas como materiais restauradores dentários estéticos em meados da década de 1960. E, atualmente, são os materiais restauradores mais usados em dentisteria, devido a seguirem os princípios da medicina dentária minimamente invasiva e oferecerem uma aparência esteticamente agradável (Dionysopoulos & Gerasimidou, 2021).

A tecnologia destes compósitos avançou significativamente nos últimos anos, principalmente devido ao aumento das demandas estéticas dos pacientes. Além disso, as melhorias nas propriedades físicas e mecânicas destes materiais (Preusse *et al.*, 2021) e as preocupações com o uso da amálgama, tornaram as resinas compostas mais populares na prática da medicina dentária moderna (Dionysopoulos & Gerasimidou, 2021).

As resinas compostas são constituídas por partículas de carga inorgânica (vidro, sílica e quartzo), matriz orgânica e agentes de união/silano. Adicionalmente, contêm também os fotoiniciadores de polimerização, pigmentos e compostos opacos (Giard, 2020). A matriz orgânica é feita à base de polímeros, que consistem em monómero base, como: o Bis-GMA (Bisfenol Metacrilato de Glicidila) e o UDMA (Uretano Dimetacrilato) e monómeros diluentes, como o TEDGMA (trietilenoglicol dimetacrilato) e o HEMA (hidroxietil metacrilato) (Demirel *et al.*, 2020).

A polimerização das resinas compostas fotopolimerizáveis é iniciada por luz visível, com comprimento de onda entre 400 e 500 nm, emitida por lâmpadas (Giard, 2020). Durante a polimerização, as moléculas de monómeros ligam-se, formando uma rede espacial conectada às partículas de carga inorgânica, para formar uma cadeia de polímeros (Małkiewicz *et al.*, 2017). Isto ocorre através da conversão das ligações de carbono duplas (C=C) presentes nas moléculas de monómeros, em ligações de carbono simples (C-C), presentes na cadeia de polímeros. Sendo esta taxa denominada como grau de conversão (DC) de uma resina (Cender, Guler, Odabasi, 2021).

Dados na literatura correlacionam a diminuição do DC, numa diminuição nas propriedades físico-mecânicas e num aumento na libertação de monómeros residuais destes materiais (Kincses *et al.*, 2021). Entretanto, existem vários fatores internos nas resinas que

afetam o grau de conversão do monómero, como a estrutura química e tamanho dos monómeros dentro do composto, proporção e tamanho das partículas de carga e a concentração dos fotoiniciadores e, fatores externos, tais como, modo de polimerização e espessura da camada do material aplicado (Cender, Guler, Odabasi, 2021).

Apesar dos avanços na dentisteria adesiva, as resinas compostas ainda tendem a falhar em restaurações posteriores extensas, principalmente devido a deterioração da interface adesiva, pela ocorrência da contração de polimerização e/ou polimerização incompleta, particularmente em restaurações classe II com margens cervicais situadas em cimento ou dentina (Kruly *et al.*, 2018). Os defeitos na interface adesiva podem surgir durante o processo de polimerização, já que os compósitos resinosos sofrem contração de polimerização que gera encolhimento volumétrico do material, ocasionando tensões que podem levar à formação de micro lacunas na interface entre o dente e a restauração e, assim, pode resultar em microinfiltração de saliva e bactérias, degradação da interface adesiva, cárie secundária, alterações pulpares e, conseqüentemente, falha clínica da restauração dentária (Veloso *et al.*, 2019; Moura *et al.*, 2021).

A técnica de inserção incremental da resina composta é recomendada para garantir uma melhor integridade marginal, porque reduz o estresse de contração da polimerização (Rizzante *et al.*, 2019; Moura *et al.*, 2021). Esta técnica consiste na aplicação de incrementos de resina com espessura máxima de 2mm, proporcionando um alto grau de conversão de monómeros em polímeros, devido a fotopolimerização em profundidade do incremento de compósito (Tauböck, Jäger, Attin, 2018). No entanto, apesar das vantagens da técnica incremental que garante uma melhor polimerização e distribuição de tensões, esta técnica é trabalhosa, sensível e demorada (Gonçalves *et al.*, 2018).

## **1.1 - Resinas Bulk fill**

Neste contexto, nos últimos anos surgiram uma nova classe de resinas compostas, denominadas Bulk fill e, que foram desenvolvidas para facilitar e agilizar o procedimento restaurador, uma vez que permitem a sua inserção em camada única, não necessitando da realização da técnica de inserção incremental (Haugen *et al.*, 2020).

As resinas Bulk fill possuem modificações nas suas formulações químicas e propriedades de polimerização e, foram desenvolvidas para minimizar ou eliminar a

contração de polimerização, aumentando sua profundidade de polimerização. Estes compósitos são inseridos na cavidade dentária em incremento único de 4 a 6 mm e, apresentam baixa tensão de contração e alto grau de polimerização nesta profundidade, devido principalmente ao aumento da translucidez e à presença de moduladores de polimerização (Tardem *et al.*, 2019).

Embora vários materiais com diferentes viscosidades e características de manuseio sejam comumente classificados como resinas compostas Bulk fill, suas propriedades podem mudar consideravelmente, especialmente devido às modificações presentes na sua matriz orgânica, como a incorporação de monómeros com maior peso molecular, bem como alterações nas partículas de carga inorgânica (Meereis, Münchow, Oliveira, Silva, Piva., 2018).

Estes compósitos podem ser subdivididos de acordo com sua consistência em materiais com alta viscosidade (pastosas) ou com baixa viscosidade, também denominados fluidos (Benedetto, 2020). As resinas Bulk fill fluidas geralmente apresentam baixa resistência ao desgaste, necessitando ser recobertas por uma camada de resina convencional, o que promove um aumento no tempo de confecção da restauração em comparação com as resinas Bulk fill de alta viscosidade e mesmo em relação às resinas convencionais (Bellinaso, Soares, Rocha, 2019).

Apesar das propriedades físico-mecânicas das resinas Bulk fill terem sido extensivamente investigadas, dados científicos quanto à sua biocompatibilidade ainda são limitados (Demirel *et al.*, 2020). Desta forma, ainda não é claro se o grau de conversão da resina na profundidade de 4-6mm está ou não comprometido, o que aumentaria seu potencial efeito citotóxico, principalmente nas resinas Bulk fill fluidas, que têm um maior teor de matéria orgânica na sua composição (Nascimento *et al.*, 2018).

## **2 - Biocompatibilidade em Materiais Dentários**

Os biomateriais dentários idealmente devem ser atóxicos para todos os tecidos orais, sejam tecidos duros ou tecidos moles. Assim, uma das principais características dos materiais é a biocompatibilidade. Já que, independentemente das excelentes propriedades físico-mecânicas que um material possa apresentar, se ele prejudicar um doente ou um profissional, ele é inadequado para uso (Haugen *et al.*, 2020). Apesar do interesse geral e

do uso crescente de resinas compostas, ainda existem preocupações sobre sua estabilidade bioquímica e biocompatibilidade. Inicialmente, as pesquisas sobre esses compósitos concentraram-se em melhorar suas propriedades físico mecânicas. Entretanto, nos últimos anos, vários estudos foram realizados no sentido de investigar a biocompatibilidade e toxicidade deste material (Demirel *et al.*, 2020).

Os efeitos das forças mastigatórias e da degradação química de restaurações dentárias podem causar a liberação de substâncias nocivas na polpa ou na saliva, podendo assim, atingir a corrente sanguínea (Tauböck *et al.*, 2017). Desta maneira, monómeros residuais não polimerizados, presente nas restaurações dentárias de resina composta, que permanecem fisicamente contidos, mas não quimicamente ligados aos polímeros, podem ser mobilizados pelos efeitos sinérgicos da adsorção de água, degradação bacteriana e enzimática, carga oclusal e mudanças de temperatura na cavidade oral (Haugen *et al.*, 2020). Um exemplo é o bisfenol metacrilato de glicidila (Bis-GMA), um monômero comumente usado, mas que é suscetível à degradação bacteriana por *Streptococcus mutans* (Huang *et al.*, 2018).

Quase todos os componentes das resinas compostas podem ser eluídos para a cavidade oral, como as partículas de carga, silano, fotoiniciadores e, provavelmente, muitas outras substâncias não identificadas e produtos de degradação (Haugen *et al.*, 2020). Entretanto, a eluição de monómeros de resina é de particular interesse devido os seus potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e estrogénicos, que podem ocasionar processos inflamatórios nos tecidos da mucosa oral, gengival e pulpar (Girão *et al.*, 2020). Estão descritas reações alérgicas, como asma, inflamação nos olhos e nariz e, dermatite de contacto (Maalekipour, Safari, Barekatin, Fathi, 2021).

A biocompatibilidade da resina composta é determinada principalmente por seu grau de conversão (DC), pois este fator pode indicar a maior ou menor liberação de monómeros não polimerizados durante seu processo de fotopolimerização, na cavidade oral (Girão *et al.*, 2020). Na literatura, a taxa de conversão de monómeros é de 42% para TEGDMA, 54-85% para Bis-GMA e 76-87% para UDMA (Cender, Guler, Odabasi, 2021).

A fim de aumentar o grau de conversão de materiais compósitos à base de resina, monómeros de baixo peso molecular, como o hidroxietil metacrilato (HEMA) e o trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), são normalmente utilizados como monómeros diluentes. No entanto, esses monómeros também reduzem os níveis de glutathione celular (antioxidante natural), o que pode causar estresse oxidativo e quebra da molécula de

DNA. Além do HEMA e TEGDMA, o bisfenol metacrilato de glicidila (Bis-GMA), que é um monómero base frequentemente usado em compósitos de resina, também demonstrou genotoxicidade dependente da dose, podendo aumentar o número de micronúcleos e quebra da molécula de DNA (Tauböck *et al.*, 2017).

Estudos recentes, mostraram que o monómero Bis-GMA é o mais tóxico, seguido pelo UDMA, TEGDMA e HEMA. Embora os mecanismos da citotoxicidade induzida por esses monómeros, não tenham sido completamente explicados, os efeitos citotóxicos observados em diferentes níveis, podem estar relacionados com seus diferentes pesos moleculares. Entre estes monómeros, o Bis-GMA apresenta o maior peso molecular, enquanto o HEMA tem o menor. Outro mecanismo de citotoxicidade sugerido, é a alteração das camadas lipídicas das membranas celulares causadas por esses monómeros, que podem influenciar a permeabilidade da membrana. Com base nessa teoria, foi atribuído maior toxicidade ao Bis-GMA, pela sua lipossolubilidade na membrana celular (Demirel *et al.*, 2020).

### 3 – Citotoxicidade

A citotoxicidade refere-se ao potencial tóxico de uma determinada substância no âmbito celular, podendo até induzir a morte celular por vários mecanismos. Atualmente, diversos tipos de testes *in vitro* foram recomendados pela Organização Internacional para Padronização (ISO) 10993 para medir a citotoxicidade de materiais dentários (ISO, 2009; ISO, 2012). Estes incluem os testes de contacto direto, onde o material dentário e as células são colocadas em contacto direto; o teste de contacto indireto, no qual uma barreira é posta entre as células e o material dentário; e o teste de extratos, no qual as linhagens celulares são expostas ao eluato/extrato do material dentário (Demirel *et al.*, 2020). E, conforme a norma ISO 10993-5:2009 para testes de citotoxicidade *in vitro*, as amostras podem ser divididas em diferentes categorias de citotoxicidade: não citotóxica ou citotóxica leve, moderada ou grave (ISO, 2009; Haugen *et al.*, 2020).

A citotoxicidade das resinas Bulk fill analisadas neste trabalho foi determinada anteriormente pelos ensaios de MTT e Cristal violeta (Avelar, 2017; Neves, 2017).

### **3.1 – Ensaio MTT**

O ensaio MTT é um dos testes mais usados em estudos de citotoxicidade. Em 1983, ele foi desenvolvido por Mosmann et al e consiste num ensaio colorimétrico que é capaz de determinar a viabilidade celular, estimando a citotoxicidade de um material. O reagente MTT, brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, é um sal mono-tetrazólio, hidrossolúvel e de cor amarela, que através da ação das desidrogenases mitocondriais sofre redução numa molécula insolúvel em água, de cor azul-violeta, chamada formazan. O MTT pode passar através da membrana interna mitocondrial de células viáveis e é reduzido à formazan pelas células metabolicamente ativas. (Stockert, Horobin, Colombo, Blázquez-Castro, 2018). Desta forma, este ensaio deteta apenas as células vivas, sendo que a quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e conseqüentemente à viabilidade celular. As principais vantagens deste teste são sua precisão e rapidez, além da ausência de qualquer radioisótopo (Ghasemi, Turnbull, Sebastian, Kempson, 2021).

### **3.2 – Ensaio do Cristal Violeta**

O ensaio do Cristal Violeta (CV), também é um teste colorimétrico simples e capaz de reproduzir a citotoxicidade, de maneira semelhante ao ensaio MTT. O corante cloreto de hexametilpararosanilina, comumente conhecido como Cristal Violeta (CV) ou Violeta Genciana, é um corante capaz de atravessar a membrana plasmática das células eucariotas e acumular-se no núcleo das células, corando o DNA das células viáveis. O cristal de violeta acumulado é solubilizado e medido fotometricamente. Desta forma, o número de células viáveis está correlacionado com a quantidade de DNA corado e, quanto maior o valor da densidade ótica maior será a quantidade de células viáveis (Neves, 2017).

Os estudos de citotoxicidade referidos anteriormente, utilizando as resinas Bulk fill mostraram que todas elas induzem a morte celular dependendo da concentração utilizada (Avelar, 2017; Neves, 2017) e por isso neste trabalho fomos determinar se estas mesmas resinas Bulk fill induzem alterações a nível do DNA, ou seja, se são genotóxicas.

## 4 - Genotoxicidade

A genotoxicidade refere-se à capacidade de qualquer fator biológico, físico ou químico causar danos a informação genética de uma célula, seja promovendo mutações (alterações na sequência das bases do DNA) ou induzindo modificações estruturais na dupla cadeia de nucleótidos do DNA. A mutagenicidade refere-se apenas a alterações na sequência de nucleótidos do DNA. Desta maneira, todos os fatores mutagênicos são genotóxicos, mas nem todas as genotoxinas são mutagênicas. Embora as células possuam muitos mecanismos de reparação do DNA, às vezes eles falham, o que pode levar à fixação do dano, se a célula danificada sobreviver e se dividir, transmitindo a alteração do DNA às próximas gerações. (Sommer, Buraczewska, Kruszewski, 2020).

No mundo moderno, os seres humanos estão expostos a diferentes agentes genotóxicos presentes no meio ambiente poluído. Portanto, são necessários testes para determinar o nível de exposição e risco para a saúde. Apesar de muitos testes classificados como “biomonitoramento *in vivo*” estarem disponíveis, o ensaio dos micronúcleos (MN) é um dos melhores e mais popular. Este ensaio é amplamente utilizado para testar a genotoxicidade *in vitro*, sendo considerado um biomarcador preditivo na avaliação da genotoxicidade (Kirsch-Volders, Fenech, Bolognesi, 2018).

Atualmente, os testes de genotoxicidade *in vitro* mais utilizados incluem: a) teste de indução de mutação de nucleotídeo, como por exemplo, teste de mutação reversa bacteriana (teste de Ames), teste de mutação genética de células de mamíferos ou ensaio de linfoma de ratinhos e, b) teste de alteração do genoma mais complexos, através dos métodos citogenéticos, como o ensaio de trocas das cromátides-irmãs, análise de frequência de aberração, ensaio dos micronúcleos por bloqueio da citocinese (CBMN) e ensaio cometa (eletroforese em gel de célula única). E os testes *in vivo* mais importantes incluem três métodos citogenéticos, nomeadamente ensaio cometa, ensaio de aberração cromossômica e diferentes tipos de ensaio do MN, incluindo CBMN, MN em eritrócitos (EMN) ou MN em células bucais (BMN) (Mohamed, Sabita, Rajendra, Raman, 2017).

#### 4.1 - Ensaio dos Micronúcleos (MN)

O ensaio dos micronúcleos foi introduzido no final do século XIX, por Howell e Jolly e, atualmente é um teste amplamente utilizado e fiável para avaliar danos citogenéticos. Este ensaio é baseado na frequência encontrada de micronúcleos no citoplasma celular. Os micronúcleos são fragmentos ou cromossomas inteiros que não atingem os polos do fuso durante a mitose e, podem ser visualizados microscopicamente como uma massa de cromatina citoplasmática próxima ao núcleo. (Gavić *et al.*, 2019). O uso do ensaio MN para estudar micronúcleos como marcador preditivo, ou para fins de biomonitorização, oferece alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de danos genotóxicos causados por diversos fatores químicos e físicos, incluindo a exposição à radiação ionizante, que frequentemente induz danos ao DNA (Rincón & Sánchez, 2021).

A versão mais popular do ensaio dos MN é o teste do micronúcleo por bloqueio da citocinese (CBMN). Como o MN é visível apenas após a divisão celular, usa-se a citocalasina B que inibe a polimerização dos filamentos de actina e a formação de microfilamentos do anel contrátil, inibindo a citocinese (divisão do citoplasma). No entanto, a citocalasina B não interrompe a cariocinese (divisão do núcleo celular após a duplicação do DNA), assim, as células binucleadas são formadas com os eventuais micronúcleos (MN) presentes no citoplasma (Carvalho, 2019).

A influência da citocalasina B na proliferação celular e na indução de MN foi amplamente discutida no passado e, concluiu-se que na maioria dos casos, o uso da citocalasina B não induz MN adicionais, portanto, seu uso é seguramente recomendado. O CBMN é muito utilizado, em linfócitos e linhagens celulares diversas, de humanos, ratinhos, coelhos, entre outros, com o objetivo de realizar biomonitorização, dosimetria biológica, avaliação da genotoxicidade *in vivo* ou *in vitro* e/ou em experiências biológicas para avaliação do dano citogenético, associado à presença de MN nas células binucleadas, onde a citocinese foi interrompida pela adição da citocalasina B (Sommer, Buraczewska, Kruszewski, 2020).

O teste do MN fornece uma base abrangente para a investigação *in vitro* de potenciais danos aneugénicos (alterações no número de cromossomas celulares), devido a produtos químicos, como por exemplo pelo tabagismo e pesticidas, ou clastogénicos (aberrações estruturais nos cromossomas) causadas por exemplo, pela radiação ionizante, amarelo de acridina, benzeno, óxido de etileno, arsénio, fosfina, entre outros. As

informações sobre os testes de genotoxicidade *in vitro* por micronúcleos foram reunidas, revistas e sistematizadas na 487ª Diretriz da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD, 2016). Além disso, foi estabelecido um Projeto Internacional de Micronúcleo Humano (HUMN), que tem o maior banco de dados de micronúcleos em células bucais e linfócitos humanos (Anjo, 2021).



## 2 - OBJETIVOS

Este estudo *in vitro* teve como principal objetivo avaliar e comparar a genotoxicidade dos extratos de três diferentes resinas Bulk fill: Filtek One Bulk fill, Coltene Fill-Up! e Tetric EvoCeram Bulk fill.

Para tal, a genotoxicidade foi determinada pela realização do ensaio dos micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN), através da exposição das células de fibroblastos de ratinho da linhagem celular 3T3 a diferentes concentrações dos extratos das resinas Bulk fill analisadas.



### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Materiais

##### 1.1. Resinas Compostas Bulk fill

Neste estudo *in vitro*, foram avaliadas três resinas compostas do tipo Bulk fill de marcas distintas (Figuras de 1 a 3), que são comumente usadas em medicina dentária na realização de tratamentos restauradores de dentisteria.

##### 1 - Filtek One Bulk fill

A resina composta Filtek One Bulk fill, representada na figura 1, é indicada para realização de restaurações anteriores e posteriores diretas (incluindo as superfícies oclusais); base/revestimento sob restaurações diretas; reconstruções de cotos; talas/splinting; restaurações indiretas incluindo facetas, onlays e inlays; reparação de defeitos em restaurações de porcelana, esmalte e temporárias; selamento de fissuras em pré-molares e molares e restauração em dentes decíduos.



**Figura 1** - Apresentação comercial da resina Filtek One Bulk fill.

## 2 - Tetric EvoCeram Bulk fill

A resina composta Tetric EvoCeram Bulk fill, representada na figura 2, é indicada para realização de restauração de dentes posteriores (classes II e I, incluindo a substituição de cúspides); restaurações de classes V (defeitos cuneiformes, erosões radiculares e cáries cervicais); preenchimentos reconstrutivos; selamento de fissuras em pré-molares e molares e restauração em dentes decíduos.



**Figura 2** - Apresentação comercial da resina Tetric EvoCeram Bulk fill.

## 3 - Coltene Fill-Up!

A resina Coltene Fill-Up!, representada na figura 3, é um compósito radiopaco e fluido com óxido de zinco antibacteriano numa seringa de automistura, utilizado para a terapêutica de obturação na região dentária posterior. É indicado para realização de restauração direta de cavidades de classe II e I; revestimento de cavidades - primeira camada para cavidades de classe I e II e, reconstrução de núcleos.



**Figura 3** - Apresentação comercial da resina Coltene Fill-Up!.

### 1.1.1. Análise comparativa das resinas compostas utilizadas

A tabela 1 permite comparar as três resinas compostas do tipo Bulk fill analisadas neste estudo experimental, Filtek One Bulk fill, Coltene Fill-Up! e Tetric EvoCeram Bulk fill.

**Tabela 1:** Características das Resinas compostas Bulk fill testadas

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>FILTEK ONE BULK FILL</b>	<b>TETRIC EVOCERAM BULK FILL</b>	<b>COLTENE FILL-UP!</b>
<b>Matriz orgânica</b>	AUDMA, AFM, UDMA, DDDMA	Dimetacrilatos	Metacrilatos
<b>Partículas inorgânica</b>	Sílica e zircônia individualizados e agregados, trifluoreto de itérbio	Vidro de bário, trifluoreto de itérbio, copolímeros e óxidos mistos	Vidro dentário, sílica amorfa e óxido de zinco
<b>Tamanho das partículas inorgânica</b>	4nm-100nm	40nm-3µm	2µm
<b>Vol% da porção inorgânica</b>	58,5	53-54	49
<b>Incrementos (mm)</b>	5	4	5
<b>Tempo de polimerização (seg)</b>	20 (1000-2000 mW/ cm <sup>2</sup> )	10 (≥1000mW/cm <sup>2</sup> )	7 (1200-1600mW /cm <sup>2</sup> )
<b>Fabricante</b>	3M ESPE	Ivoclar Vivadent	Coltene
<b>Lote, Validade</b>	NC89361, 2024-01	Y44990, 2023-10	L64399, 2024-04

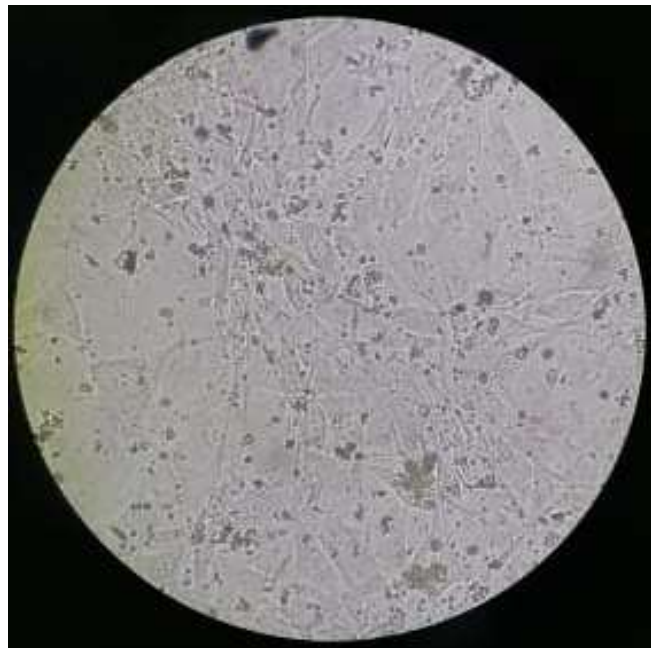
Fonte: informações apresentadas na bula dos materiais, fornecidas pelos fabricantes.

## 1.2. Linha Celular

No presente estudo, foram usadas as células NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), atualmente NIH 3T3 fibroblast cells (93061524), adquiridas da “Health Protection Agency Culture Collections” produzidas pela Sigma e, que equivalem a uma linhagem celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de ratinho (3T3).

Em cultura celular, as 3T3 reproduzem-se indefinidamente e por isso são denominadas de linha celular contínua, sendo as respostas citotóxica e genotóxica comparáveis às linhas celulares primárias de humanos. Apresentam formato fusiforme, com prolongamentos citoplasmáticos típicos (estrelados) e núcleo central, crescem de maneira aderente e formam uma monocamada de células (ver Figura 4).

As células 3T3 são considerados fibroblastos de referência nos estudos *in vitro* de citotoxicidade e genotoxicidade de materiais dentários, devido a apresentarem inibição de contacto e não serem tumorigénicas, bem como possuírem boa reprodutibilidade e alta taxa de crescimento celular (ISO, 2018). Entretanto, apesar das células 3T3 mimetizarem os fibroblastos humanos presentes nos tecidos gengivais e na polpa dentária, é sabido que os resultados obtidos com estas células não podem ser diretamente transpostos, já que a mucosa oral apresenta maior resistência ao contacto com agentes tóxicos, devido à presença de queratina e mucina.



**Figura 4** - Células 3T3 Aderentes, microscópio óptico invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA) (Ampliação 400x em contraste de fase).

### 1.3. Reagentes

Os reagentes usados no presente trabalho estão listados na Tabela 1.

**Tabela 2:** Lista de Reagentes

<b>Reagente</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
Mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i> <i>ready made solution</i>	Sigma, Aldrich	M5353
Cytochalasin B from <i>Drechslera dematioidea</i>	Sigma, Aldrich	C6762
Giemsa, azul-eosina-methylene blue solution for microscopy	Merck, EUA	1.09204.2500
Solução de <i>Tripan Blue</i> (0,4%); filtrado- esterilizado	Sigma, Aldrich	T8154
DMSO, <i>Dimetilsulfóxido</i> , filtrado-esterilizado	Sigma, Aldrich	D2650
DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas	Sigma, Aldrich	D5796
PBS, <i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Tampão fosfato 10x; pH 6,0-7,0	Sigma Aldrich	D1408
Gentamicina 50mg/ml	Sigma, Aldrich	G1397
PNA 100xc, Piruvato de Sódio 100mM	Sigma, Aldrich	S8636
<i>Bovine Calf Serum (CBS)</i>	Sigma, Aldrich	12133C
Trypsin-EDTA solution 10xc; filtrado- esterilizado; pH 6,4-7,0	Sigma, Aldrich	T4174
Pen10000U/ml/Streptomicina 10 mg/ml	Sigma, Aldrich	P4333
Fungizona, <i>Anfoterizina B</i> , filtrado-esterilizado 250 µg/ml	Sigma, Aldrich	A2942
Metanol	Sigma, Aldrich	322415

## 2 - Métodos

Os procedimentos laboratoriais de cultura celular e de preparação das resinas compostas, foram realizados numa câmara de fluxo laminar Scanlaff, Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dinamarca), previamente desinfetada com álcool a 70% e após uso de luz ultravioleta (UV). Todo o material utilizado foi esterilizado em autoclave ou adquirido comercialmente estéril. Desta forma, as condições de assepsia exigidas foram devidamente asseguradas durante o protocolo experimental.

### 2.1. Preparação das Culturas de Células

Inicialmente, as células 3T3 que estavam armazenadas em criotubos e mantidas congeladas em nitrogénio líquido a  $-140^{\circ}\text{C}$  (Figura 5), foram descongeladas e posteriormente transferidas para um tubo Falcon contendo 5ml de meio de cultura (DMEM) simples. Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 1000 rpm durante 3 minutos, com o intuito de remover o DMSO (substância utilizada para manter a integridade celular durante o processo de congelamento). Posteriormente, o sobrenadante foi deitado fora e o pellet de células foi posto num frasco de cultura de  $25\text{cm}^2$  (T25) com 6ml de DMEM completo.



Figura 5 – Células 3T3 armazenadas em criotubos a  $-140^{\circ}\text{C}$ .

O meio de cultura (DMEM) completo é composto pelo DMEM simples suplementado em laboratório com 10% de soro CBS, 0,1% de gentamicina 50mg/ml, 1% de Fungizona a 250µg/ml, 1% de PNA 100mM, 1% NEM 100x e 1% de solução de pen/strep 10000 U/ml/10mg/ml.

Em seguida, as 3T3 foram incubadas a 37°C em estufa, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, para que as mesmas tivessem as condições ideais para aderirem à superfície do frasco T25 e proliferarem até alcançar aproximadamente uma confluência de 80%, ou seja, quando 80% do fundo do T25 está coberto por células aderentes em monocamada.

Atingida esta confluência são feitas as subculturas celulares, com o intuito de evitar que a concentração de células ultrapasse a capacidade do T25, evitando a paragem do crescimento celular. Desta forma, é realizado uma passagem da cultura de células mãe para outro T25, de maneira a perpetuar a proliferação de células (subculturas). Para tal, as células 3T3 aderentes foram lavadas com 5ml de tampão fosfato (PBS) 0,01 M, posteriormente foi realizada a sua remoção após tripsinização, através da adição de 1,5ml de tripsina 1xc e incubação a 37°C, durante 2 minutos em estufa.

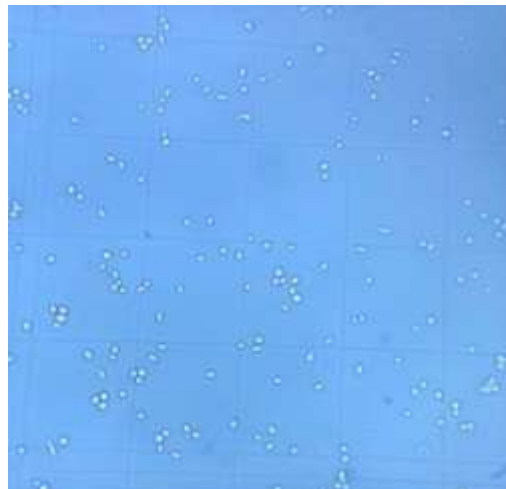
A tripsinização promove a hidrólise das proteínas de adesão das células, a fim de causar o descolamento das 3T3 aderentes às paredes do frasco T25. Em seguida, as células foram observadas ao microscópio óptico (MO) invertido para constatar se estavam destacadas e, após confirmação, foi adicionado 4,5ml de DMEM completo, para inativar a tripsina. Posteriormente, esta suspensão foi transportada para um tubo Falcon de 15ml e foi realizada a centrifugação a 1000rpm durante 5 minutos (centrifuga Sigma, modelo 3-16 PK), o sobrenadante foi deitado fora e o pellet de células foi ressuspensionado em 1 ml de DMEM completo.

Posteriormente, foi feita a quantificação destas células através da contagem do número de células vivas. Para isto, foi utilizado uma mistura contendo 10µL da suspensão de células 3T3 e 10µL de solução de *tripan blue* 0,5%, que tem a capacidade de penetrar na membrana das células mortas, mas não consegue ultrapassar a membrana das células vivas, distinguindo as células vivas das células mortas, que ficam com coloração azul. Desta forma, retiram-se 10 µL desta mistura e colocam-se, por capilaridade, numa câmara de Neubauer, modelo 8100104 Hirschmann Neubauer-improved (Hirschmann, Alemanha) (ver Figura 6). A contagem celular é realizada através da observação em MO invertido (ampliação 100x), nos 4 conjuntos de 16 quadrados da câmara de contagem (ver Figura 7). Para determinar o número de células vivas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$N^{\circ}$  células/mL= (média do n<sup>o</sup> de células por quadrante (4 contagens/4) x fator diluição x  $10^4$ ).



**Figura 6** – Câmara de Neubauer



**Figura 7** – Células 3T3 presentes numa câmara de Neubauer, microscópio ótico invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA),(Ampliação de 100x).

Para a realização das subculturas, utilizaram-se cerca de  $2,5 \times 10^5$  células para cada frasco de cultura T25, contendo 6 ml de DMEM completo.

## 2.2. Preparação dos Cilindros de Resinas

Os cilindros de resina composta (Figura 8) foram confeccionados a partir da aplicação das diferentes resinas num molde metálico com poços de 4mm de altura x 4mm de diâmetro (ver Figura 9). Em seguida, a resina foi fotopolimerizada através da utilização do fotopolimerizador de alta intensidade LED (COXO) (Intensidade  $\geq 1200$  mW/cm<sup>2</sup>; comprimento de onda: 420-480 nm), durante o tempo estipulado pelos fabricantes: Filtek Bulk fill - 20 segundos, Tetric EvoCeram Bulk Fill - 10 segundos e Coltene Fill-Up! - 7 segundos.

Para a preparação dos extratos eluídos potencialmente genotóxicos, os cilindros de resina já fotopolimerizados foram levados individualmente do molde de metal para o tubo Falcon, com meio de cultura numa razão de 8 cilindros para 2 ml de meio, onde permaneceram a incubar, em estufa a 37°C numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.



**Figura 8** -Confeção dos cilindros das diferentes resinas compostas.



**Figura 9** - Molde Metálico utilizado na confeção dos cilindros das diferentes resinas compostas.

### 2.3. Ensaio dos Micronúcleos

Após ter sido identificada a concentração da dose letal para 50% das células em cultura ( $DL_{50}$ ) para cada uma das resinas analisadas, através da realização prévia de ensaios MTT, iniciou-se o ensaio dos micronúcleos. Para isto, foram colocados  $2,5 \times 10^5$  células 3T3 em 5ml de meio de cultura (DMEM) completo em frascos T25 e incubadas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , numa atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Passadas as 24 horas de proliferação celular, foi retirado o meio de cultura dos frascos e as células 3T3 foram incubadas com as diferentes concentrações dos extratos das três resinas testadas, preparadas conforme a Tabela 2. No controlo negativo foi adicionado apenas 5ml de meio de cultura completo (não foi adicionado nenhum genotóxico) e no controlo positivo foi adicionado aos 5ml de DMEM completo,  $12,5\mu\text{l}$  de mitomicina (genotóxico) numa concentração final de  $0,75\mu\text{m}$ , visando formar micronúcleos nestas células.

**Tabela 3:** Preparação das diferentes concentrações dos extratos das três Resinas Bulk fill

Resinas Bulk fill		Concentrações dos Extratos (%)	Extrato das Resinas (ml)	DMEM completo (ml)	
F I L T E K	T E T R I C	C	75	3,75	1,25
		O	50	2,5	2,5
		L	20	1	4
		T	5	0,25	4,75
		E	1	0,050	4,95
		E	0,5	0,025	4,975

Após as 24 horas de crescimento celular na presença dos genotóxicos (Figura 10), o meio foi removido dos frascos T25 e as células foram lavadas com 3ml de meio de cultura (DMEM) completo, posteriormente, adicionou-se 5ml de DMEM completo e  $150\mu\text{l}$  de citocalasina B às células, à concentração final de  $6\mu\text{g/ml}$  por T25. A citocalasina

B é usada por atuar no bloqueio da citocinese, impedindo a separação do citoplasma celular após a mitose. Desta forma, conduz a formação de células binucleadas (Drozd, Bubko, Jaworska, Gruber-Bzura, 2019).



**Figura 10** – Cultura celular 3T3, após 24hs de incubação com diferentes concentrações de genotóxicos.

Passadas 26 horas de incubação com citocalasina B, as células são tripsinizadas e lavadas com DMEM completo. Posteriormente, as células são submetidas a tratamento hipotônico (com 0,5ml de DMEM completo diluído com H<sub>2</sub>O estéril 1:4) e incubadas durante 2 minutos em estufa. Depois adiciona-se 1,5 ml de DMEM completo não diluído. Em seguida, centrifuga-se por 5 minutos a 131g e deita-se fora o sobrenadante. Depois ressuspendem-se as células do pellet em cerca de 50 µl de DMEM completo.

Posteriormente, espalham-se 15 µl da suspensão celular para fazer os esfregaços em cada lâmina, obtendo-se cerca de 4 a 5 lâminas por condição. As lâminas ficam a secar ao ar, durante 30 a 60min. Em seguida, as lâminas são fixadas durante 30 minutos com metanol a -20°C e depois devem ficar novamente a secar. Após o processo de secagem, as lâminas são coradas com solução de Giemsa a 4% em tampão fosfato 10 mM - pH 6,8, durante 8 minutos. Em seguida, retira-se o excesso do corante com água e as lâminas ficam a secar à temperatura ambiente (Figura 11).



**Figura 11** - Lâminas confeccionadas a partir dos diferentes extratos das Resinas Bulk fill.

No final as lâminas são observadas ao microscópio óptico (Optika B-350, Itália), realizando a contagem celular conforme a quantidade de núcleos (monucleadas, binucleadas e trinucleadas) e quanto à presença dos micronúcleos (MN) nestas células, confirmados pela observação com a objetiva de 100x do microscópio.

Em relação a avaliação da genotoxicidade dos extratos das três resinas Bulk fill analisadas, obtida através da realização do ensaio dos micronúcleos (MN), foi baseada somente pela contagem do número total de micronúcleos em 1000 células binucleadas (BN), MN/1.000 BN.

## 4 - RESULTADOS

### 1. Polimerização das Resinas

As polimerizações das resinas Bulk fill foram realizadas conforme as condições estipuladas pelos fabricantes, principalmente quanto ao tempo de exposição à luz, consoante a intensidade do fotopolimerizador. Foi verificado que as três resinas Bulk fill obtiveram diferentes consistências após a fotopolimerização (Tabela 4 e figura 12).

A resina Filtek One Bulk fill apresentou uma consistência firme, semelhante à das resinas compostas convencionais, condizente a uma polimerização aparentemente completa.

Entretanto, a resina Tetric EvoCeram Bulk fill apresentou uma consistência média após a fotopolimerização, sugerindo uma polimerização incompleta.

Por sua vez, a resina Coltene Fill-Up! demonstrou uma boa consistência em sua superfície que esteve em contacto direto com a luz, contudo, a outra superfície apresentou-se pastosa, sugerindo uma polimerização incompleta também.

**Tabela 4:** Resultado da polimerização das diferentes resinas Bulk fill

<b>Resina</b>	<b>Polimerização</b>	<b>Consistência</b>
Filtek One Bulk fill	Completa	Firme
Tetric EvoCeram Bulk fill	Incompleta	Média
Coltene Fill-Up!	Incompleta	Pastosa



**Figura 12** -Consistência dos cilindros das três diferentes resinas Bulk fill após a polimerização

## 2. Genotoxicidade

### 2.1. Ensaio dos Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN)

Foram realizados três ensaios experimentais independentes, consoantes as três diferentes resinas Bulk fill analisadas. Em cada ensaio foi feito um controlo positivo (C+), no qual as células foram colocadas em contacto com a mitomicina C (substância que induz a formação de micronúcleos) e, um controlo negativo (C-), onde as células 3T3 não foram expostas a nenhum genotóxico (conforme Tabela 5). Por ensaio, as células 3T3 foram expostas a seis concentrações diferentes dos extratos da resina testada e contabilizado os diferentes tipos de células observadas (conforme Tabelas 6, 7 e 8).

Os resultados representados na Tabela 5 evidenciaram, como era expectável, que no controlo negativo foram encontradas poucas células binucleadas com presença de micronúcleos. Já no controlo positivo, foram observadas várias células binucleadas com micronúcleos. Entretanto, em todas as lâminas foram observadas em maior ou menor quantidade, células mononucleadas (figura 13), binucleadas (figura 14) e trinucleadas (figura 15), com ou sem a presença de micronúcleos. Também nos vários ensaios foram encontradas células 3T3 binucleadas com presença de vários micronúcleos (figura 16).

**Tabela 5:** Contagem celular dos controlos negativos e controlos positivos dos três Ensaio realizados em simultâneo com células expostas a diferentes concentrações das três Resinas Bulk fill

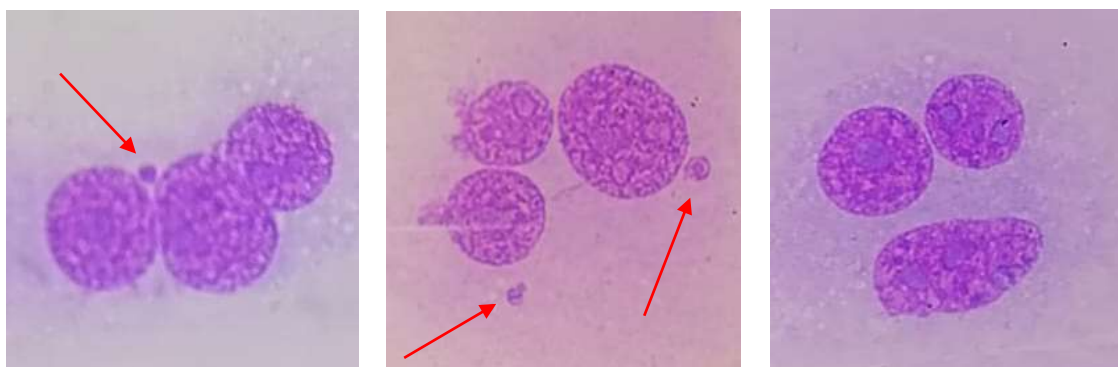
Células observadas	Controlos do Ensaio com Filtek One Bulk fill		Controlos do Ensaio com Tetric EvoCeram Bulk fill		Controlos do Ensaio com Coltene Fill-Up!	
	C-	C+	C-	C+	C-	C+
<b>Mononucleadas sem MN</b>	1523	6613	2188	5348	1937	5424
<b>Mononucleadas com MN</b>	27	334	36	319	31	336
<b>Binucleadas sem MN</b>	971	288	962	280	961	283
<b>Binucleadas com MN</b>	35	721	44	728	47	721
<b>Trinucleadas sem MN</b>	10	16	14	14	11	15
<b>Trinucleadas com MN</b>	1	37	2	32	2	35
<b>Total de células</b>	2567	8009	3246	6721	2989	6814



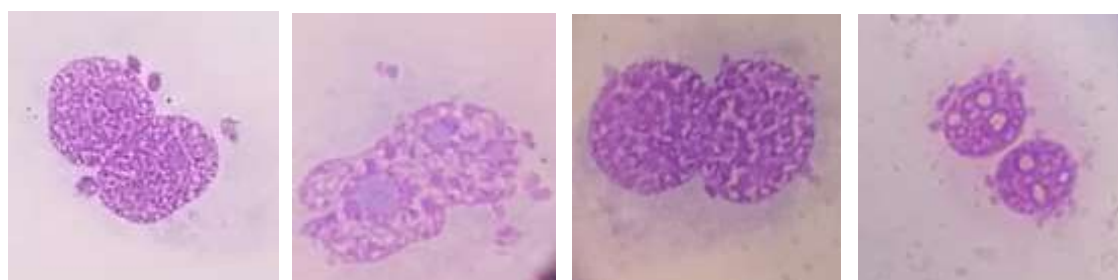
**Figura 13** - Células 3T3 Mononucleadas com ou sem MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).



**Figura 14** - Células 3T3 Binucleadas com ou sem MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).



**Figura 15** - Células 3T3 Trinucleadas com ou sem MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).



**Figura 16** - Células 3T3 Binucleadas com vários MN, microscópio ótico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).

**Tabela 6:** Contagem celular do Ensaio dos CBMN, realizado com a Resina Filtek One Bulk fill

Células observadas	Concentrações dos Extratos de Resina Filtek One Bulk fill							
	C-	C+	75%	50%	20%	5%	1%	0,5%
<b>Mononucleadas sem MN</b>	1523	6613	3263	1846	1743	2298	1928	2235
<b>Mononucleadas com MN</b>	27	334	139	87	79	75	59	62
<b>Binucleadas sem MN</b>	971	288	750	844	905	910	943	937
<b>Binucleadas com MN</b>	35	721	255	158	104	97	68	64
<b>Trinucleadas sem MN</b>	10	16	24	18	11	13	12	12
<b>Trinucleadas com MN</b>	1	37	11	8	8	6	4	4
<b>Total de células</b>	2567	8009	4442	2961	2850	3399	3014	3314

Conforme os valores apresentados na Tabela 6, verificou-se que na exposição a diferentes concentrações dos extratos da Resina Filtek One Bulk fill foi alcançado a contagem mínima de 1000 células binucleadas.

**Tabela 7:** Contagem celular do Ensaio dos CBMN, realizado com a Resina Tetric EvoCeram Bulk fill

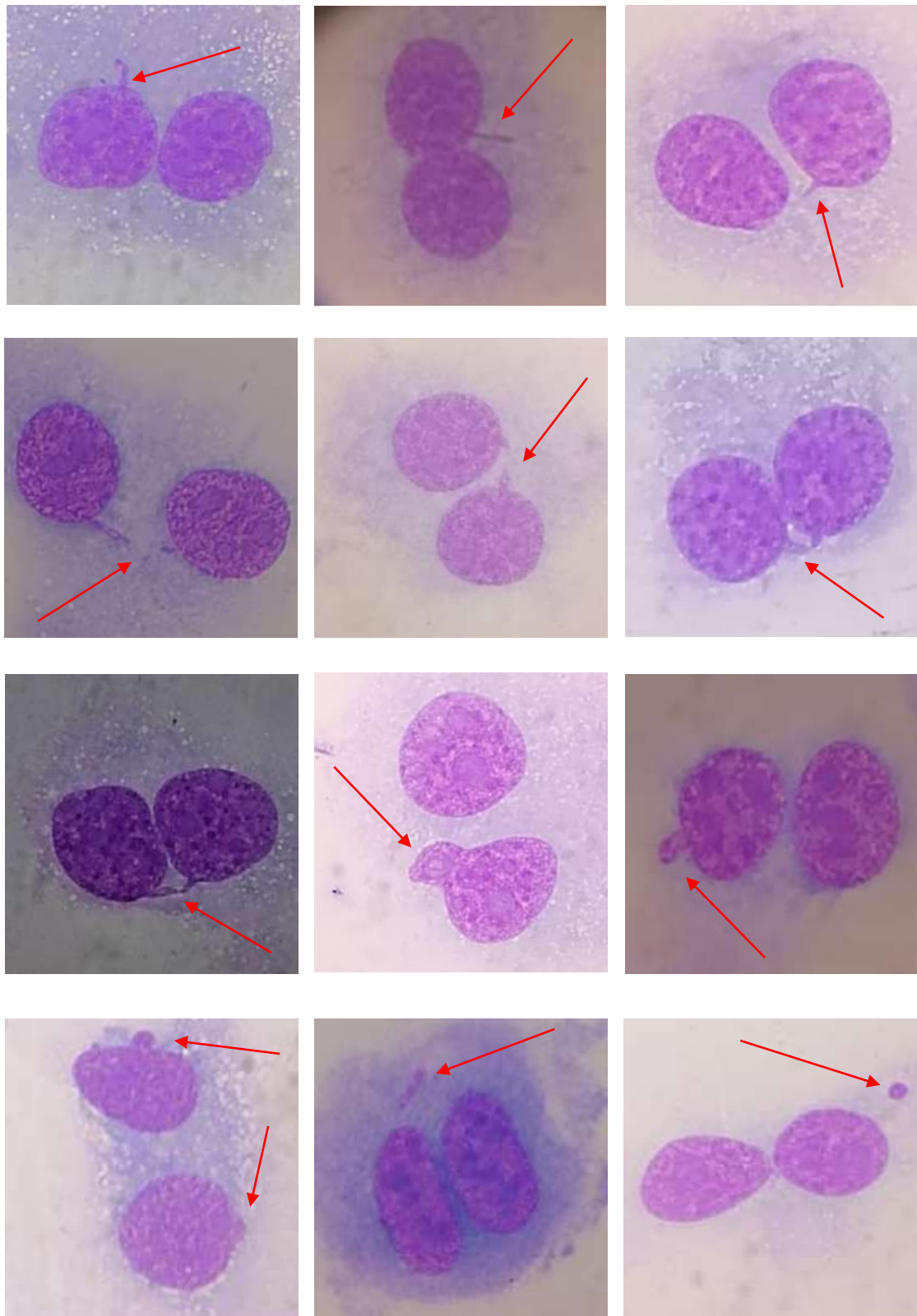
Células observadas	Concentrações dos Extratos de Resina Tetric EvoCeram Bulk fill							
	C-	C+	75%	50%	20%	5%	1%	0,5%
<b>Mononucleadas sem MN</b>	2188	5348	1274	4153	3869	2992	2027	1758
<b>Mononucleadas com MN</b>	36	319	26	286	153	123	98	83
<b>Binucleadas sem MN</b>	962	280	11	672	724	794	843	877
<b>Binucleadas com MN</b>	44	728	32	333	280	214	164	128
<b>Trinucleadas sem MN</b>	14	14	2	32	22	24	26	25
<b>Trinucleadas com MN</b>	2	32	6	15	13	10	8	7
<b>Total de células</b>	3246	6721	1351	5491	5061	4157	3166	2878

**Tabela 8:** Contagem celular do Ensaio dos CBMN, realizado com a Resina Coltene Fill-Up!

Células observadas	Concentrações dos Extratos de Resina Coltene Fill-Up!							
	C-	C+	75%	50%	20%	5%	1%	0,5%
<b>Mononucleadas sem MN</b>	1937	5424	1218	5303	4306	3767	3576	2861
<b>Mononucleadas com MN</b>	31	336	84	328	301	241	135	114
<b>Binucleadas sem MN</b>	961	283	1	302	653	674	749	802
<b>Binucleadas com MN</b>	47	721	44	705	353	327	253	208
<b>Trinucleadas sem MN</b>	11	15	0	15	29	31	21	19
<b>Trinucleadas com MN</b>	2	35	3	32	15	13	11	7
<b>Total de células</b>	2989	6814	1350	6685	5657	5053	4745	4011

De acordo com os valores indicados nas Tabelas 7 e 8, verificou-se que na maioria das exposições das células às diferentes concentrações dos extratos da Resina Tetric EvoCeram Bulk fill e da Resina Coltene Fill-Up! foi alcançado a contagem mínima de 1000 células binucleadas, com exceção da concentração de 75% do extrato de ambas resinas. Nestes casos, o número de células presentes nas lâminas diminuiu muito após a exposição a esta concentração nos dois Ensaios dos CBMN realizados, indicando uma forte toxicidade dos extratos mais concentrados.

### 2.1.1 - Diferentes Formatos de MN em células Binucleadas



**Figura 17** – Células 3T3 Binucleadas com diferentes formas de MN, microscópio óptico Optika B-350 (Itália). (Ampliação 1000x).

A contagem das células Binucleadas com micronúcleos incluiu as células em que os micronúcleos têm uma forma irregular, nomeadamente aparecendo como pontes entre os núcleos, ou como bolhas dos núcleos ou com uma forma alongada indicando que a formação dos micronúcleos resultou de diferentes mecanismos (Kirsch-Volders *et al.*, 2011).

## 2.2 - Cálculos de Proliferação Celular e Frequência de Micronúcleos

O Ensaio de Micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) do presente estudo, permite analisar o efeito citostático (paragem da proliferação celular) através do Índice de Proliferação das células com bloqueio da citocinese (Cytokinesis-Block Proliferation Index – CBPI) ou através da Percentagem de células BiNucleadas (%BN). A frequência de Micronúcleos em mil células BiNucleadas (MNBN%) permite determinar um índice de genotoxicidade dos extratos.

### 2.2.1 - Índice de Proliferação de células com bloqueio da citocinese (Cytokinesis-Block Proliferation Index – CBPI) ou Índice de Não Divisão (NDI)

Na presença citocalasina B, este índice CBPI permite medir o número de ciclos celulares durante o período de exposição aos diferentes tóxicos. O seu valor deve ser maior que 1, de modo a garantir que as células se dividiram pelo menos uma vez (um ciclo de replicação). Quando o valor de CBPI é igual a 1 significa que todas as células são mononucleadas. O valor de CBPI pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{CBPI} = \frac{\sum \text{células mononucleares} + 2x \sum \text{células binucleares} + 3x \sum \text{células multinucleares}}{\text{número total de células}}$$

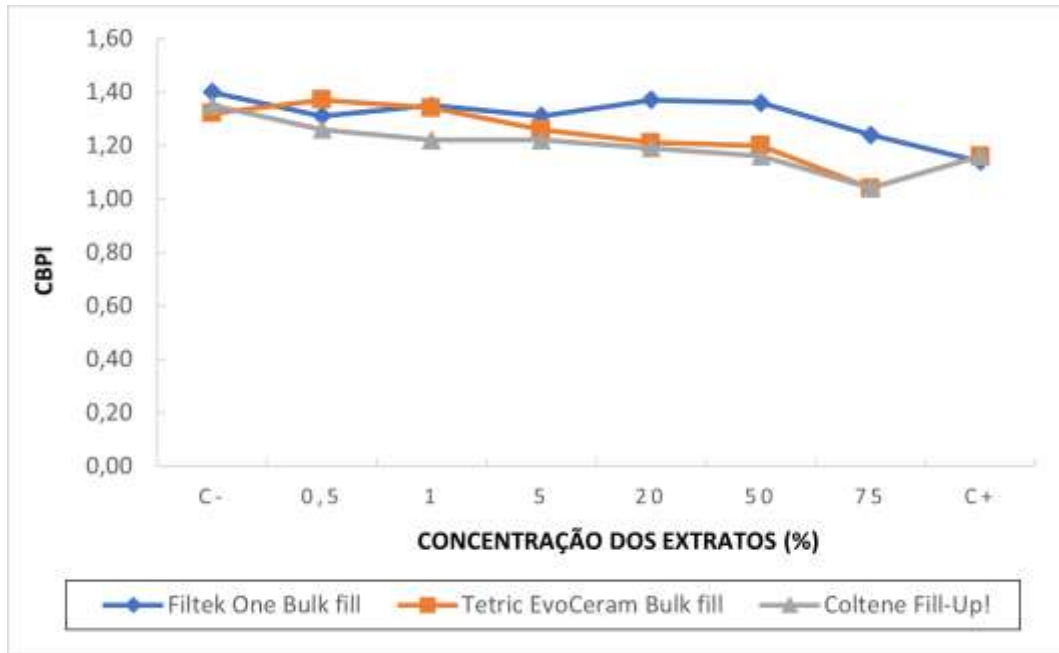
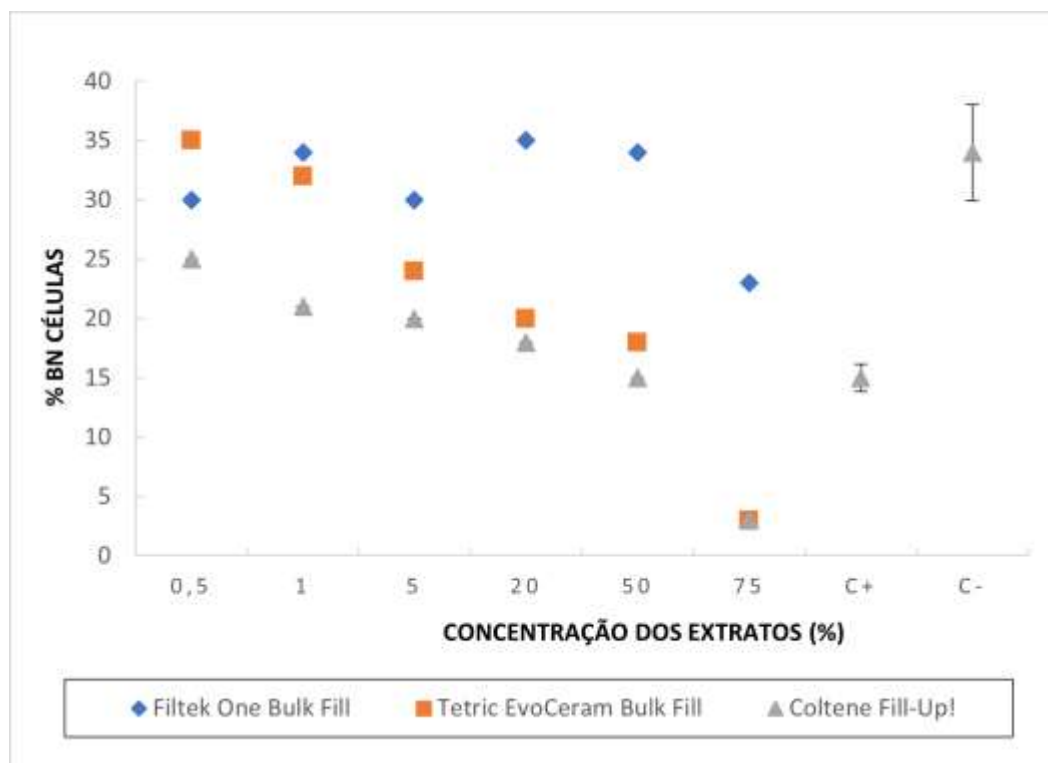


Figura 18 – Cálculo do Índice de Proliferação de células com bloqueio da citocinese (CBPI).

Os resultados apresentados na Figura 18, mostram valores do CBPI > 1 em todas as concentrações dos extratos das resinas dos três ensaios de CBMN realizados, evidenciando que houve proliferação celular. No entanto, à medida que aumenta a concentração dos extratos de Tetric EvoCeram Bulk fill e de Coltene Fill-Up! observa-se uma diminuição do índice de proliferação celular. Apesar disso, não se observam diferenças significativas no Índice de proliferação das células expostas aos extratos das diferentes resinas.

## 2.2.2 - Percentagem de células BiNucleadas (%BN)

Esta percentagem revela o efeito citostático (paragem da proliferação celular) devido à presença dos extratos das resinas, que é obtido através da soma das células binucleadas a dividir pelo número total de células. Conforme os resultados demonstrados na Figura 19, obtivemos valores baixos e variáveis entre 3-39%.



**Figura 19** – Cálculo da Percentagem de Células Binucleadas (%BN).

A percentagem de células Binucleadas na presença das diferentes concentrações do extrato de Filtek One Bulk fill mantem-se constante até à concentração de 50%, diminuindo bastante na concentração de 75%, indicando uma paragem da proliferação celular a esta concentração mais elevada. A percentagem de células Binucleadas também diminui linearmente com o aumento da concentração dos extratos das resinas Tetric EvoCeram Bulk fill e de Coltene Fill-Up! e, nos extratos de 75% diminui drasticamente, indicando a diminuição da proliferação celular (Figura 18 e 19).

### 2.2.3 - MicroNúcleos em células BiNucleadas (‰MNBN)

Este cálculo corresponde ao índice de genotoxicidade, ou seja, determina a incidência de células com micronúcleos em 1000 células binucleadas, através da razão entre o número de células binucleadas com MN em 1000 células binucleadas (Figura 20).

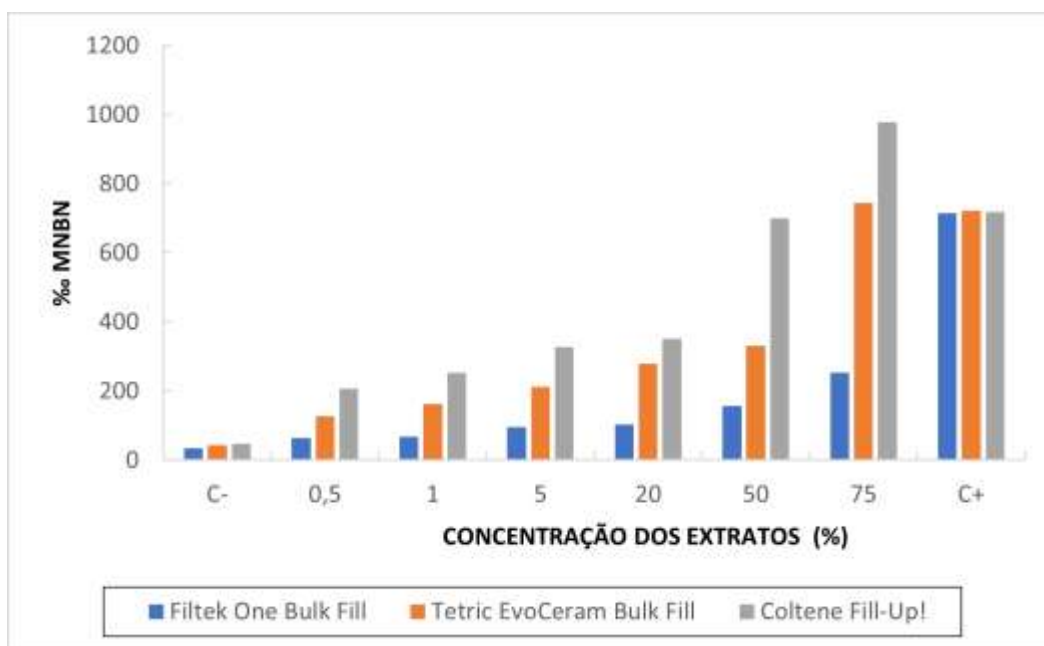


Figura 20 – Cálculo dos Micronúcleos em células binucleadas (MNBN%).

Conforme os valores apresentados na Figura 20, na presença dos extratos das várias resinas, a frequência de MN em células binucleadas (%MNBN) mostraram uma tendência crescente de dose-resposta. A formação dos MN induzidos pelos extratos à concentração de 75% foi significativa para as Resinas Tetric EvoCeram Bulk fill e Coltene Fill-Up!, no entanto, estes valores não devem ser considerados para determinar o índice de genotoxicidade, dado que nestas condições também houve paragem de proliferação celular.

Observou-se que a resina que induz mais efeitos genotóxicos nas células 3T3 foi a Resina Coltene Fill-Up! atingindo nos extratos a 50%, um índice de genotoxicidade 15 vezes superior ao do controlo negativo. Estes extratos apresentam valores de genotoxicidade idênticos à genotoxicidade induzida pela Mitomicina, utilizada como controlo positivo de genotoxicidade. Os extratos de 50% da resina Tetric EvoCeram Bulk fill apresentam um índice de genotoxicidade de 7,6 vezes superior ao do controlo negativo. Já os extratos de 50% da resina Filtek One Bulk fill, apresentam um índice de genotoxicidade de 4,6 vezes superior ao do controlo negativo.

## 5- DISCUSSÃO

No presente estudo, sobre a biocompatibilidade das resinas Bulk fill, os ensaios genotóxicos foram realizados com células de fibroblastos 3T3 de ratinho, porque são células estáveis em cultura e os fibroblastos são abundantes e precursores da maioria dos vários tipos de células gengivais e pulpares que podem estar em contacto com substâncias lixiviáveis de resinas dentárias por períodos prolongados. Além disso, este modelo de célula tem sido recomendado nas diretrizes de citotoxicidade (ISO, 2009; 2018).

Estudos recentes demonstraram uma baixa biocompatibilidade das resinas Bulk fill, com presença de citotoxicidade nas células estaminais da polpa dentária humana (Lee *et al.*, 2019), nos osteoblastos humanos (Haugen *et al.*, 2020), nos fibroblastos humanos (Chaharom *et al.*, 2020) e nas células de neurônios corticais (Kamalak *et al.*, 2018). Pela análise de culturas celulares de fibroblastos de ratinho em tempo real (Demirel *et al.*, 2020) observou-se reação inflamatória em tecidos vivos de ratinho, após inoculação subcutânea deste tipo de resina (Girão *et al.*, 2020). Entretanto, em nenhum destes estudos foi analisado a genotoxicidade das resinas Bulk fill.

Lee *et al.* (2019), avaliaram a citotoxicidade de três resinas Bulk fill (SDR, Venus Bulk fill e Beautifil Bulk Flowable) e de uma resina composta convencional fluida (controlo) e os seus efeitos na anti diferenciação das células estaminais da polpa dental humana. Neste estudo, foram confeccionados cilindros de resinas individuais com espessuras de 2mm e colocados a uma distância de 0-2, 2-4 e 4-6mm do local da fotopolimerização. Posteriormente, os extratos de resinas foram incubados por 24hs em contacto direto com as células estaminais, previamente extraídas de terceiros molares humanos. Observaram-se diferenças na citotoxicidade das resinas Bulk fill dependendo da profundidade do local de fotopolimerização na seguinte ordem: 4-6mm > 2-4mm > 0-2 mm. Além disso, a diferenciação das células estaminais foi mitigada nas cavidades profundas (4-6mm). Desta maneira, é necessário cuidado na escolha das resinas Bulk fill, especialmente em restaurações de cavidades profundas, para que a viabilidade e capacidade de diferenciação das células estaminais da polpa dentária seja mantida.

Posteriormente, Haugen *et al.* (2020) realizaram uma caracterização abrangente de duas resinas Bulk fill fluidas (SDR Flow- SDR e Filtek Bulk Fill Flowable- FBF) e uma resina composta convencional (Tetric EvoCeram- TEC). Dentre os parâmetros examinados, destaca-se o efeito citotóxico em osteoblastos humanos, fibroblastos

gingivais humanos e células cancerosas. A biocompatibilidade das resinas Bulk fill foi semelhante à da resina composta convencional quando em contacto com células epiteliais e fibroblastos. Entretanto, em relação aos osteoblastos, todas as resinas apresentaram efeito citotóxico, sendo que, FBF apresentou citotoxicidade grave (50% de morte celular) e a TEC foi moderadamente citotóxica (30% de morte celular), enquanto a resina convencional foi considerada levemente citotóxica (20% de morte celular). Concluiu-se que deve ser evitado o uso da Bulk fill- FBF em cavidades profundas de classe II, devido à possível difusão de seus compostos resultantes da degradação da resina que parecem ser tóxicos para os osteoblastos.

Demirel *et al.* (2020), avaliaram a citotoxicidade de 10 resinas compostas Bulk fill em fibroblastos de ratinho (L929), através da análise celular em tempo real (a cada 30 min num intervalo de 72 h). Foram testadas 5 resinas fluidas (Filtek Bulk fill Flowable, Smart Dentin Replacement, X-tra base, Venus Bulk fill e Beautifil-Bulk Flowable) e 5 resinas pastosas (Filtek Bulk fill Posterior Restorative, QuiX fill Posterior Restorative, X-tra fill, Tetric EvoCeram Bulk fill e Beautifil-Bulk Restorative) e como controlo foi utilizada uma resina composta convencional. Nenhuma das resinas Bulk fill manteve a viabilidade celular acima dos 70% após 48 e 72 hs de exposição, o que indica que todas são citotóxicas. As resinas Bulk fill fluidas e pastosas da mesma marca, exibiram propriedades citotóxicas semelhantes. Para a resina Tetric EvoCeram Bulk fill, a viabilidade celular foi reduzida para 71% após 24hs, 37% em 48hs e 21% em 72hs de exposição. Assim, os dados deste estudo sugerem um possível efeito genotóxico da resina Tetric EvoCeram Bulk fill, que foi confirmado em nosso presente estudo.

No estudo realizado por Girão *et al.* (2020), foi analisado a influência do grau de conversão (DC) e dos resíduos fotopolimerizáveis na biocompatibilidade de três resinas Bulk fills (Tetric N-Ceram Bulk fill, Filtek One Bulk fill e Sonic Fill) sobre o perfil inflamatório no tecido subcutâneo de ratinhos vivos. Foram confeccionados discos de resinas com espessuras de 2 mm (superficial) e 4 mm (profundo). Em seguida, os discos foram implantados em quatro quadrantes no tecido subcutâneo de ratinhos. Após 7, 14 e 28 dias, foi realizado a análise histológica da intensidade do processo inflamatório. A resina Sonic Fill de 4mm foi a que apresentou menor DC, alta proporção de Bis-GMA residual e infiltrado inflamatório intenso após 28 dias, maior do que nos outros grupos. Já a resina Filtek One Bulk Fill, que tem AUDMA (uretano dimetacrilato aromático) e UDMA (uretanos dimetacrilatos) em sua composição, apresentou maior DC e menor toxicidade. Os resultados deste estudo, corroboraram os dados da literatura que relatam

uma relação direta entre o DC e a intensidade do infiltrado inflamatório e, que o grau de conversão aumenta na seguinte ordem: Bis-GMA < Bis-EMA < UDMA < TEGDMA.

No nosso estudo, também verificamos que a resina Filtek One Bulk fill apresentou o menor efeito genotóxico entre as resinas Bulk fill analisadas. Após a fotopolimerização, a Filtek One Bulk fill apresentou uma consistência firme, semelhante à das resinas compostas convencionais, condizente com uma polimerização aparentemente completa, sugerindo um alto grau de DC. Já as resinas Tetric EvoCeram Bulk fill e Coltene Fill-Up! apresentaram uma consistência média e pastosa, respectivamente; sugerindo uma polimerização incompleta em ambas as resinas. Apesar de somente os fabricantes da resina Filtek One Bulk fill terem especificado os monômeros presentes em sua composição, nossos resultados sugerem que a genotoxicidade encontradas nas resinas Bulk fill é inversamente proporcional ao DC, corroborando estudos prévios (Girão *et al.*, 2020).

Kamalak *et al.* (2018), investigaram potenciais respostas celulares e efeitos biológicos das resinas Bulk fill em células de neurônios corticais após dois tempos de exposição diferentes (24 e 72hs). O estudo incluiu 5 resinas Bulk fill fluidas: Surefil SDR Flow (SS), X-tra Base Flow (XB), Venus Bulk Flow (VBF), Filtek Bulk Flow (FBF) e Tetric-Evo Flow (TE). As amostras de resina foram fotopolimerizadas por 20-40s, conforme as instruções dos fabricantes. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTT, o antioxidante total e o status oxidante total foram examinados usando kits de diagnóstico de ensaio real. Os resultados evidenciaram que todas Bulk fill testadas foram citotóxicas na fase aguda e esses efeitos induziram morte celular após diferentes períodos de exposição. Citotoxicidade significativa foi detetada nos grupos TE, XB, SS, FBF e VBF em 24 e 72 horas, respectivamente. Entretanto, observou-se que o VBF e FBF causaram um efeito mais tóxico nos neurônios e maior degeneração quando comparada com as outras resinas Bulk fill, o que pode ser explicado pelo menor teor de carga inorgânica presente nestas resinas.

O efeito do pré-aquecimento das resinas Bulk fill no grau de conversão das resinas compostas e o possível efeito na citotoxicidade, foi investigado por Chaharom *et al.* (2020). Neste estudo, três diferentes resinas Bulk fill foram analisadas: Tetric N-Ceram Bulk Fill (TNB), Xtrafil (XF) e Xtrabase (XB), as quais possuem percentagens de carga inorgânica de 61%, 86% e 75%, respectivamente. De cada resina foram preparadas 10 amostras, sendo 5 amostras pré-aquecidas a 68°C e as outras 5 polimerizadas à temperatura ambiente (25°C). A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do MTT em

fibroblastos humanos. A resina TNB, que possui o menor teor de carga inorgânica entre as resinas testadas, foi a que apresentou maior citotoxicidade. Concluiu-se que o pré-aquecimento da resina Bulk fill não afetou a toxicidade induzida nos fibroblastos humanos. Além disso, a citotoxicidade de diferentes resinas compostas Bulk fill variou dependendo de sua composição química, corroborando com os estudos prévios (Kamalak *et al.*, 2018).

É sabido que uma percentagem maior de carga inorgânica pode reduzir a solubilidade da resina composta. Isto sugere que as resinas compostas com maior teor de carga inorgânica oferecem uma menor taxa de adsorção de solvente em comparação com as resinas compostas com baixo teor de carga inorgânica. Além disso, uma menor adsorção de solvente pode resultar em menor liberação de componentes, incluindo os monómeros (Lempel *et al.*, 2016). No nosso estudo, foi observado que a resina que induz mais efeitos genotóxicos nas células 3T3 foi a Resina Coltene Fill-Up! seguida pela Resina Tetric EvoCeram Bulk fill e pela resina Filtek One Bulk fill. Desta maneira, os nossos resultados corroboraram os estudos prévios (Kamalak *et al.*, 2018; Chaharom *et al.*, 2020), já que de acordo com as informações do fabricante, as percentagens de carga inorgânicas presentes nas resinas Filtek One Bulk fill, Tetric EvoCeram Bulk fill e Coltene Fill-Up! são 58,5%, 53-54% e 49%, respectivamente.

Atualmente, tem havido uma necessidade constante de desenvolver novos e mais rápidos ensaios citogenéticos para medir a instabilidade induzida por agentes genotóxicos no campo da pesquisa citogenética, um exemplo disso é o ensaio de micronúcleos. Os micronúcleos são fragmentos ou cromossomas completos que permanecem no citoplasma celular durante a mitose (Rincón & Sánchez, 2021). O ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN), devido à sua alta sensibilidade e especificidade tornou-se um dos métodos mais populares para avaliar a genotoxicidade de diferentes fatores químicos e físicos, incluindo danos no DNA induzidos por diversos materiais dentários (Sommer, Buraczewska, Kruszewski, 2020).

Nesse contexto, Rajić *et al.* (2018) investigaram a citotoxicidade e genotoxicidade de 6 resinas compostas distintas, sendo três convencionais (Tetric EvoCeram, Filtek Ultimate e G-aenial) e três fluídas (Tetric EvoFlow, Filtek Ultimate Flow e G-aenial Flo). Para avaliar a genotoxicidade dos materiais dentários, foram utilizadas duas concentrações diferentes de cada resina, polimerizada e não polimerizada, através do ensaio de micronúcleos em linfócitos humanos. Concluiu-se que as resinas compostas convencionais polimerizadas não apresentaram efeito citotóxico ou

genotóxico, o que é importante para a aplicação clínica destes materiais. Entretanto, as resinas não fotopolimerizadas exibiram citotoxicidade e genotoxicidade, devido a presença de monómeros em sua composição, como Bis-GMA, UDMA e TEGDMA, que em contacto direto com os linfócitos, induziram a apoptose dos mesmos.

Posteriormente, Gavić *et al.* (2019) realizaram um estudo clínico prospectivo e longitudinal durante um período de três meses para avaliar possíveis danos ao DNA de células bucais expostas a diferentes materiais dentários, através do ensaio de micronúcleos. O estudo incluiu 60 jovens sem restaurações prévias em que foram realizadas restaurações de classe II com um dos três materiais testados (ionómeros de vidro: Ketac Molar ou Ionofil Molar e um compómero: Twinky Star) durante o estudo. O dano ao DNA foi analisado por ensaios de micronúcleo, em células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal. Em todas as amostras coletadas 90 dias após o tratamento, não houve diferença estatística no número de quaisquer alterações celulares. Neste estudo foi confirmada a biocompatibilidade a longo prazo dos materiais testados, ionómeros de vidro e compómeros são materiais amplamente utilizados em odontopediatria, e este estudo comprovou sua segurança para o uso em crianças.

Mais recentemente, Bandarra *et al.* (2021) realizaram estudo *in vitro* para definir e comparar a genotoxicidade e citotoxicidade dos eluatos de diferentes cimentos dentários: cimento resinoso (RelyX Unicem 2 Automix), cimento de ionómero de vidro convencional (Ketac Cem Easymix) e cimento de ionómero de vidro modificado por resina (Ketac Cem Plus). Os efeitos genotóxicos foram determinados pela utilização do ensaio de micronúcleos em células de fibroblastos de ratinhos, 3T3. Para as amostras de cimento resinoso, 2 procedimentos de polimerização foram realizados: num o cimento foi deixado auto polimerizar por 1 hora e, noutro o cimento foi polimerizado por 20 segundos com fotopolimerizador. O cimento de ionómero de vidro convencional não foi considerado citotóxico ou genotóxico, enquanto os eluatos de cimento de ionómero de vidro modificado por resina e cimento resinoso, independentemente do método de polimerização, foram citotóxicos nos fibroblastos. A citotoxicidade máxima foi observada na presença de cimento resinoso, que também apresentou genotoxicidade, independentemente do tipo de polimerização realizada.

Com relação ao estudo de genotoxicidade das resinas Bulk fill, existem poucos dados na literatura. Tauböck *et al.* (2017), realizaram a primeira investigação *in vitro* com objetivo de avaliar a genotoxicidade de três resinas compostas Bulk fill fluidas (SDR, Venus Bulk fill e X-tra base) e de uma resina composta convencional fluida (Tetric

EvoFlow), aplicadas em camada de 4 mm de espessura e fotoativadas em diferentes tempos de exposição (20 e 30 segundos). A genotoxicidade foi avaliada em leucócitos humanos utilizando o ensaio de micronúcleos. Concluíram que as resinas Bulk fill testadas, ao contrário da resina composta convencional, aplicadas em 4 mm de espessura e fotoativadas por no mínimo 20s, não induziram efeitos genotóxicos relevantes. E, que o tempo de irradiação de 20s ( $\approx 1200 \text{ mW/cm}^2$ ) pode ser suficiente para que os compósitos de resina Bulk fill sob investigação, não induzam efeitos genotóxicos aos leucócitos humanos.

Mais recentemente, estudo *in vitro* realizado por Anjo (2021) analisaram a genotoxicidade de uma resina composta Bulk fill, nomeadamente a Coltene Fill-Up!, com espessura de 5mm e exposta ao tempo de fotopolimerização de 7s ( $\geq 1200 \text{ mW/cm}^2$ ), conforme o estipulado pelo fabricante. A genotoxicidade do compósito foi investigada em células de fibroblastos 3T3 de ratinho, as quais foram expostas a diluições diferentes dos extratos de resina, através do Ensaio de Micronúcleos. Constatou-se alteração da morfologia celular em relação às células do controlo positivo e negativo, podendo ser justificada pela alta genotoxicidade da resina testada. Nos fibroblastos que foram expostos aos extratos de resina, observou-se a presença de micronúcleos e fragmentação nuclear, o que tornou estas células inviáveis (devido a quebra do DNA) e ocasionou a inibição da proliferação celular. Concluiu-se que a resina Bulk fill Coltene Fill-Up! tem capacidade genotóxica, provavelmente devido ao seu baixo grau de conversão dos monómeros.

Em nosso estudo, foi constatado que a resina Bulk fill Coltene Fill-Up! era genotóxica para as células de fibroblastos 3T3 de ratinho. Além disso, esta resina apresentou o maior valor do índice de genotoxicidade entre as resinas Bulk fill testadas. Assim, os nossos resultados corroboraram com os resultados do estudo prévio (Anjo, 2021).

Desta maneira, como as resinas compostas Bulk fill estão em contacto com as células humanas por longos períodos, é importante compreender os seus efeitos a longo prazo. Se as células morrem através de um processo controlado, como apoptose, então o corpo humano reage e ativa mecanismos moleculares para induzir a substituição celular, levando à reparação. No entanto, se as células humanas forem expostas a um material que é citotóxico e genotóxico, então a avaliação de risco é essencial. Se as lesões no DNA induzidas por material genotóxico são transmitidas para a prole celular, então a vão ficar permanentemente na população. Dado que o cancro bucal afeta milhares de pessoas todos

os anos, os materiais dentários devem ser rigorosamente avaliados para seu potencial risco genotóxico (Bandarra *et al.*, 2021).

Os estudos *in vitro* de materiais dentários são um importante passo na triagem de seus efeitos biologicamente adversos antes da realização de modelos de estudos *in vivo*. O presente estudo mostrou que as resinas compostas Bulk fill, nomeadamente a Tetric EvoCeram Bulk fill e a Coltene Fill-Up!, que são rotineiramente utilizadas na prática clínica em medicina dentária, tem algumas questões preocupantes quanto à sua biocompatibilidade. No entanto, a toxicidade apresentada neste estudo deve ser interpretada com algum cuidado, devido às conhecidas limitações dos resultados *in vitro* sobre sua aplicação em condições clínicas. Apesar disso, este estudo indica que é necessário melhorar a segurança destas resinas Bulk fill, sobretudo das que têm consistência pastosa ou fluida.



## 6 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo *in vitro*, obtivemos as seguintes conclusões:

1- A resina Bulk fill que induziu mais efeitos genotóxicos nas células 3T3 foi a resina Coltene Fill-Up! seguida pela resina Tetric EvoCeram Bulk fill.

2- A resina Filtek One Bulk fill foi a que apresentou menor genotoxicidade nas concentrações dos extratos testados, demonstrando ser mais segura para usos clínicos prolongados.

3- É importante a consciencialização dos médicos dentistas sobre a biocompatibilidade e possível toxicidade dos materiais dentários, que podem causar lesões locais e sistémicas aos doentes. Desta maneira, os médicos dentista devem avaliar o risco e o benefício dos materiais dentários e não desconsiderar a biocompatibilidade em seu processo de tomada de decisão.



## 7 - BIBLIOGRAFIA

Anjo, E. A. (2021). Efeito citotóxico e genotóxico de três resinas compostas *Bulk Fill* utilizadas em dentisteria. (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.

Avelar, M., J. (2017). Determinação do tipo de morte celular provocado por três resinas compostas *Bulk fill* usadas em dentisteria. (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.

Bandarra, S., Neves, J., Paraíso, A., Mascarenhas, P., Ribeiro, A. C., Barahona, I. (2021). Biocompatibility of self-adhesive resin cement with fibroblast cells. *J Prosthet Dent.*, 125(4), 705.e1-705.e7. doi<sup>2</sup>: 10.1016/j.prosdent.2021.01.002

Bellinaso, M. D., Soares, F. Z. M., Rocha, R. O. (2019). Do bulk-fill resins decrease the restorative time in posterior teeth? A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *J Invest Clin Dent.* (1), 1-7. doi<sup>2</sup>:10.1111/jicd.12463

Benedetto, C. M. M. G. D. (2020). Análise comparativa entre resinas compostas Bulk-fill, nanohíbridas e nanoparticuladas atuais. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal.

Carvalho, L.R. (2019). Análise automatizada da frequência de micronúcleos em culturas celulares expostas a agentes genotóxicos físicos e químicos. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, Brasil.

Cender, E. U., Guler, C., Odabasi, D. (2021). The effects of polymerization mode and layer thickness on monomer released from Bulk fill composite resins. *Niger J Clin Pract.*, (24)10, 1442-1449. doi<sup>2</sup>: 10.4103/njcp.njcp\_676\_20

Chaharom, M. E. E., Bahari, M., Safyari, L., Safarvand, H., Shafaei, H., Navimipour, E. J., Oskoeel, P. A., Ajami, A. A., Kahnamouei, M. A. (2020). Effect of preheating on the cytotoxicity of bulk-fill composite resins. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect.*, 14(1), 19-25. doi<sup>2</sup>: 10.34172/joddd.2020.003

Demirel, G., Gür, G., Demirsoy, F. F., Altuntas, E. G., Yener-İlce, B., Kiliçarslan, M. A. (2020). Cytotoxic effects of contemporary bulk-fill dental composites: A real-time cell analysis. *Dent Mater J.*, 39(1), 101-110. doi<sup>2</sup>:10.4012/dmj.2018-336

Dionysopoulos, D., Gerasimidou, O. (2021). Wear of contemporary dental composite resin restorations: a literature review. *Restor Dent Endod.*, 46(2), 1-13. doi<sup>2</sup>:10.5395/rde.2021.46.e18

Drozd, E., Bubko, I., Jaworska, K., Gruber-Bzura, B. M. (2019). The application of an in vitro micronucleus test in mouse fibroblast L929 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* (841), 36-42. doi<sup>2</sup>:10.1016/j.mrgentox.2019.05.005

Gavić, L., Goršeta, K., Glavina, D., Željezić, D., Galić, N., Tadin, A. (2019). In vivo assessment of genotoxicity in buccal cells of children undergoing tooth restoration. *Cent Eur J Public Health*, 27(4), 312–319. doi<sup>2</sup>:10.21101/cejph.a5216

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.*, 12827(22), 1-30. doi<sup>2</sup>: 10.3390/ijms222312827

Giard, H. (2020). Efeitos de diferentes líquidos sobre a microdureza superficial das resinas compostas (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.

Girão, L. B., Martins, J. O. L., Lemos, J. V.M., Pinto, M. R., Rolim, J. P. M. L., Silva, F. C. F. A., Saboia, V. P. A., Sousa, F. B., Silva, P. G. B. (2020). Influence of the degree of conversion and Bis-GMA residues of bulk fill resins on tissue toxicity in a subcutaneous model in rats. *JABFM*, 1-10. doi<sup>2</sup>: 10.1177/2280800020947330

Gonçalves, F., Campos, L. M. P., Rodrigues-Júnior, E. C., Costa, F. V., Marques, P. A., Francci, C. E., Braga, R. R., Boaro, L. C. C. (2018). A comparative study of bulk-fill composites: degree of conversion, post-gel shrinkage and cytotoxicity. *Braz Oral Res.*, 32(17), 1-9. doi<sup>2</sup>: 10.1590/1807-3107

Haugen, H. J., Marovic, D., Par, M., Thieu, M.K.L., Reseland, J.E., Johnsen, G.F. (2020). Bulk Fill Composites Have Similar Performance to Conventional Dental Composites. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(5136), 1-21. doi<sup>2</sup>:10.3390/ijms21145136

Huang, B., Sadeghinejad, L., Adebayo, O. I. A., Ma, D., Xiao, Y., Siqueira, W. L., Cvitkovitch, D. G., Finer, Y. (2018). Gene expression and protein synthesis of esterase from *Streptococcus mutans* are affected by biodegradation by-product from methacrylate resin composites and adhesives. *Acta Biomater.*, (81), 158–168. doi<sup>2</sup>: 10.1016/j.actbio.2018.09.050

International Organization for Standardization (ISO). (2009). *10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity*. Geneva: International Organization for Standardization – ISO.

International Organization for Standardization (ISO). (2012). *10993-12: Biological evaluation of medical devices, Part 12: Sample preparation and reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization – ISO.

International Organization for Standardization (ISO). (2018). *7405: Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry*. Geneva: International Organization for Standardization – ISO.

Kamalak, H., Kamalak, A., Taghizadehghalehjoughi, A., Hacımüftüoğlu, A., Nalci, K. A. (2018). Cytotoxic and biological effects of bulk fill composites on rat cortical neuron cells. *Odontology*, (106), 377–388. doi<sup>2</sup>:10.1007/s10266-018-0354-5

Kincses, D., Böddi, K., Öri, Z., Lovász, B. V., Jeges, S., Szalma, J., Kunsági-Máté, S., Lempel, E. (2021). Pre-Heating Effect on Monomer Elution and Degree of Conversion

of Contemporary and Thermoviscous Bulk-Fill Resin-Based Dental Composites. *Polymers*, (13)3599, 1-20. doi<sup>2</sup>:10.3390/polym13203599

Kirsch-Volders, M., Fenech, M., Bolognesi, C. (2018). Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, (836), 47-52. doi<sup>2</sup>: 10.1016/j.mrgentox.2018.05.010

Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Looock, K. V., Decordier, I. (2011). The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol.*, 85(8):873-899. doi<sup>2</sup>: 10.1007/s00204-011-0691-4.

Kruly, P. C., Giannini, M., Pascotto, R. C., Tokubo, L. M., Suga, U. S., Marques A.C, Terada, R. S. S. (2018). Meta-analysis of the clinical behavior of posterior direct resin restorations: low polymerization shrinkage resin in comparison to methacrylate composite resin. *PLoS One*, 13(2), 1-18. doi<sup>2</sup>:10.1371/0191942

Lee, S. M., Kim, S. Y., Kim, J. H., Jun, S. K., Kim, H. W., Lee, J. H., Lee, H. H. (2019). Depth-Dependent Cellular Response from Dental Bulk-Fill Resins in Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells International*, (1), 1-11. doi<sup>2</sup>:10.1155/2019/1251536

Lempel, E., Czibulya, Z., Kovács, B., Szalma, J., Tóth, Á., Kunsági-Máté, S., Varga, Z., Böddi, K. (2016). Degree of conversion and BisGMA, TEGDMA, UDMA elution from flowable bulk fill compo-sites. *Int J Mol Sci.*, 17(732), 1-13. doi<sup>2</sup>: 10.3390/ijms17050732

Maalekipour, M., Safari, M., Berekatain, M., Fathi, A. (2021). Effect of Adhesive Resin as a Modeling Liquid on Elution of Resin Composite Restorations. *International Journal of Dentistry*, 3178536, 1-9. doi<sup>2</sup>:10.1155/2021/3178536

Małkiewicz, K., Wychowański, P., Olkowska-Truchanowicz, J., Tykarska, M., Czerwiński, M., Wilczko, M., Owoc, A. (2017). Uncompleted polymerization and cytotoxicity of dental restorative materials as potential health risk factors. *Ann Agric Environ Med.*, 24(4), 618–623. doi<sup>2</sup>: 10.5604/12321966.1235159

Meereis, C. T. W., Münchow, E. A., Rosa, W. L. O., Silva, A. F., Piva, E. (2018). Polymerization shrinkage stress of resin-based dental materials: a systematic review and meta-analyses of composition strategies. *J Mech Behav Biomed Mater*, (82), 268-281. doi<sup>2</sup>: 10.1016/j.jmbbm.2018.03.019

Mohamed S, Sabita U, Rajendra S., Raman D. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob J Pharmaceu Sci.* 1(5), 1-6. doi<sup>2</sup>: 10.19080/GJPPS.2017.02.555575

Moura, A. G. S. M., Melo, M. G. R. R., Santos, W. T. N. P., Bezerra, A. L. C. A., Monteiro, G. Q. M., Durão, M. A. (2021). An in vitro evaluation of the color stability of bulk-fill resin composites. *Arch Health Invest.*, 10(4), 530-535. doi<sup>2</sup>:10.21270/archi.v10i4.4973

Nascimento, A. S, Lima, D. B., Fook, M. V. L., Albuquerque, M. S., Lima, E. A., Sabino, M. A., Borges, S. M. P., Filgueira, P. T. D., Sousa, Y. C., Braz, R. (2018). Physicomechanical characterization and biological evaluation of bulk-fill composite resin. *Braz. Oral Res.* (32)107, 1-14. doi<sup>2</sup>:10.1590/1807-3107bor-2018

Neves, J. R. O. M. L. (2017). Efeito citotóxico e genotóxico de três resinas compostas *Bulk Fill* utilizadas em dentisteria. (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.

OECD. (2016). *Test n° 487: In vitro mammalian cell micronucleus test*. Paris: Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4 - OECD. doi<sup>2</sup>:10.1787/9789264264861

Preusse, P. J., Winter, J., Amend, S., Roggendorf, M. J., Dudek, M., Krämer, N., Frankenberger, R. (2021). Class II resin composite restorations - tunnel vs. box-only in vitro and in vivo. *Clinical Oral Investigations*, (25), 737–744. doi<sup>2</sup>:10.1007/s00784-020-03649-y

Rajić, V. B., Želježić, D., Ivanišević, A. M., Verzak, Z., Baraba, A., Miletić, I. (2018). Cytotoxicity and Genotoxicity of Resin Based Dental Materials in Human Lymphocytes in Vitro. *Acta Clin Croat.*, 57(2), 278-285. doi<sup>2</sup>:10.20471/acc.2018.57.02.07

Rincón, G., Sánchez, C. (2021). Short Assay Design for Micronucleus Detection in Human Lymphocytes. *BioMed Research International*, 21, 1-6. doi<sup>2</sup>:10.1155/2021/2322257

Rizzante, F.A.P., Mondelli, R. F. L., Furuse, A. Y., Borges, A. F. S., Mendonça, G., Ishikiriama, S. K. (2019). Shrinkage stress and elastic modulus assessment of bulk-fill composites. *J Appl Oral Sci.*, (27), 1-9. doi<sup>2</sup>:10.1590/1678-7757-2018-0132

Sommer, S., Buraczewska, I., Kruszewski, M. (2020). Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(1534), 1-19. doi<sup>2</sup>:10.3390/ijms21041534

Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167. doi<sup>2</sup>:10.1016/j.acthis.2018.02.005

Tardem, C., Albuquerque, E. G., Lopes, L. S., Marins, S. S., Calazans, F. S., Poubel, L. A., Barcelos, R., Barceiro, M. O. (2019). Clinical time and postoperative sensitivity after use of bulk-fill (syringe and capsule) vs. incremental filling composites: a randomized clinical trial. *Braz. Oral Res.*, 33(89), 1-13. doi<sup>2</sup>:10.1590/1807-3107

Tauböck, T. T., Jäger, F., Attin, T. (2018). Polymerization shrinkage and shrinkage force kinetics of high- and low-viscosity dimethacrylate- and ormocerbased bulk-fill resin composites. *Odontology*, 107(1):103-110. doi<sup>2</sup>: 10.1007/s10266-018-0369-y

Tauböck, T. T., Marovic, D., Zeljezic, D., Steingruber, A. D., Attin, T., & Tarle, Z. (2017). Genotoxic potential of dental bulk-fill resin composites. *Dental Materials*, 33(7), 788–795. doi<sup>2</sup>:10.1016/j.dental.2017.04.011

Veloso, S. R. M., Lemos, C. A. A., Moraes, S. L. D., Vasconcelos, B. C. E., Pellizzer, E. P., Monteiro, G. Q. M. (2019). Clinical performance of bulk-fill and conventional resin composite restorations in posterior teeth: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.*, 23(1):221-233. doi<sup>2</sup>: 10.1007/s00784-018-2429-7

