



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CITOTOXICIDADE COMPARATIVA DE 2 RESINAS
COMPOSTAS *BULK FILL*: ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por

Sílvia Apolinário Simões

Para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CITOTOXICIDADE COMPARATIVA DE 2 RESINAS
COMPOSTAS *BULK FILL*: ESTUDO *IN VITRO***

Trabalho submetido por

Sílvia Apolinário Simões

Para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Isabel Barahona

Co-orientado por

Prof. Doutora Ana Mano Azul

setembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às pessoas sem a ajuda das quais o presente estudo não seria possível.

À minha orientadora de projecto, a Professora Doutora Isabel Barahona, a quem agradeço em primeiro lugar, pelo apoio prestado em todas as fases, pela flexibilidade no uso da sala de culturas e laboratório. E por ensinar que os erros também fazem parte da ciência.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Mano Azul, pelo apoio e disponibilidade durante o projecto. E também pelo incentivo à excelência, pensamento crítico e rigor científico como parte nunca abdicável duma investigação.

À Professora Susana Bandarra, pela louvável disponibilidade, paciência e orientação no trabalho laboratorial devo um franco reconhecimento.

Ao Professor Luís Proença, pela colaboração no tratamento dos dados estatísticos.

Aos meus pais, pelo apoio em toda a vida académica, pelos sacrifícios que fizeram ao longo desta jornada apostando na minha formação, e por me estimularem sempre ao progresso e persistência. Ao meu irmão, pelos sábios conselhos.

Aos meus amigos mais próximos, em especial à Sara Santos, minha parceira de box, pela companhia, amizade e apoio constante em todos os anos de curso.

Aos fornecedores do material para este estudo, 3M™ ESPE e Ivoclar – Vivadent®.

Aos funcionários da CDUEM e Manutenção, pelo apoio na vertente técnica; seguranças, pela paciência quando trabalhava fora de horas; ao ISCSEM e restantes professores deste curso, por tudo o que ensinaram durante estes 5 anos.

RESUMO

Introdução: As resinas compostas têm sido amplamente utilizadas como material restaurador em Medicina Dentária. A toxicidade tem sido associada a alguns dos seus componentes, nomeadamente aos monómeros presentes, resultantes de polimerização incompleta, que podem eluir para a cavidade oral. O recém aparecimento no mercado duma nova gama de resinas que clama a possibilidade de restaurações em bloco com espessuras até 4 mm requer mais estudos *in vitro* e *in vivo* que garantam a sua biocompatibilidade.

Objectivo: O objectivo desta investigação foi comparar a reacção citotóxica produzida por duas marcas diferentes de resinas compostas *Bulk Fill*, nomeadamente a resina Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) e Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®), usadas na restauração dentária, em culturas de fibroblastos, a fim de inferir acerca da sua biocompatibilidade.

Métodos: Foram usadas culturas de células 3T3, que correspondem à linha celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de murganho. Os fibroblastos foram cultivados em meio *DMEM* e incubados a 37°C, numa atmosfera humidificada (5% CO₂/95% ar). Discos de cada uma das resinas com 4 mm de diâmetro e 4 mm de altura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e incubados em meio *DMEM* durante 24h para produzir extractos com os componentes eluído. As culturas foram expostas a diferentes diluições dos extractos, durante 24h. Foi quantificada a viabilidade celular através do ensaio MTT. Os resultados foram analisados estatisticamente (IBM SPSS Statistics), através do teste ANOVA *one-way* para um nível de significância de 5%.

Resultados: A citotoxicidade das resinas Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®) e Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) sobre as células na concentração de 100% foi 99,4% e 100,6% respectivamente; na concentração de 50% foi 92,9% e 96%, respectivamente. Não há diferença estatisticamente significativa entre a citotoxicidade

das duas resinas testadas. Em ambas as resinas, houve um decréscimo da viabilidade celular proporcional ao aumento da concentração ($p < 0,05$).

Conclusões Nas primeiras 24h, há liberação de componentes citotóxicos em ambas as resinas. Estas são citotóxicas em todas as diluições testadas, embora sem diferenças significativas entre elas. A identificação dos componentes tóxicos é relevante para evitar a sua utilização em Medicina Dentária.

Palavras-chave: Fibroblastos; Resinas compostas *Bulk Fill*; Citotoxicidade; MTT; Biocompatibilidade.

ABSTRACT

Introduction: The use of composite resins as restorative materials in Dentistry has been extensive. The toxicity has been linked to some of components, in particular the monomers present as a result of incomplete polymerization, which may elute into the oral cavity. The recent appearance on the market of a new range of resins that calls the possibility of restoration block with thicknesses up to 4 mm requires further studies in vitro and in vivo to ensure its biocompatibility.

Aim: The aim of this investigation was to compare the cytotoxic reaction produced by two different composite resins *Bulk fill*, namely Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) e Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®), used in dental restoration, in cultures of fibroblasts in order to infer about its biocompatibility.

Methods: We used cultures of 3T3 cells, which correspond to the cell line obtained from mouse embryonic fibroblasts. Fibroblasts were DMEM and incubated at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂/95% air). Discs of each of the resins with 4 mm diameter and 4 mm in height were prepared according to the manufacturer's instructions and incubated in DMEM for 24h to yield extracts with eluted components possibly toxic. Cultures were exposed to different dilutions of the extracts for 24 h. It was

quantified the cell viability by MTT assay. The results were analysed in IBM SPSS using *one-way* ANOVA test for a significance level of 5%.

Results: The cytotoxicity of the resins Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®) and Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) on cells at a concentration of 100 % was 99.4 % and 100.6 % respectively; at a concentration of 50% it was 92,9% e 96%. There is no statistically significant difference between the cytotoxicity of the tested resins. All dilutions of added resin extracts caused cell death. In both resins, there was a decrease in cell viability proportional to the concentration increases ($p < 0.05$).

Conclusions: In the first 24 hours, there is release of cytotoxic components in both resins. They are cytotoxic in all dilutions tested, although there are no significant differences among them. The identification of toxic components is important to avoid its use in dentistry.

Keywords: Fibroblast; *Bulk Fill* composites; Cytotoxicity; MTT; Biocompatibility.

ÍNDICE

• Resumo	1
• Índice de Figuras	7
• Índice de Tabelas	9
• Índice de Gráficos	10
• Lista de Abreviaturas	11
I. INTRODUÇÃO	
1. Resinas compostas	13
1.1 Composição	14
1.2 Reacção de polimerização e monómeros residuais	15
1.3 Propriedades físicas	16
1.4 Resinas Compostas <i>Bulk Fill</i> (RBF)	18
• Classificação	18
• Propriedades	19
• Composição	20
• Controvérsia	22
2. Biocompatibilidade	23
2.1 Propriedades biológicas e interacção com o periodonto	24
2.2 Testes de biocompatibilidade	28
• Citotoxicidade – teste do MTT	29
3. Objectivo	31
4. Hipóteses experimentais	31
II. MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Materiais	33
1.1 Resinas Compostas	33
1.2 Linha celular	35
1.3 Reagentes e equipamentos	36
2. Métodos	37
2.1 Preparação das culturas celulares	37
• Descongelamento	38
• Subculturas	39

2.2 Ensaio nº 1: Optimização do nº de células para o ensaio MTT	41
• Contagem de células	40
2.3 Preparação das resinas	41
2.4 Ensaio nº 2: Incubação de células com extractos de resina	43
• Incubação de células com extractos de resina às 24h	43
• Ensaio MTT	45
2.5 Análise estatística	47
III. RESULTADOS	
1. Ensaio nº 1: Optimização do nº de células a incubar	49
2. Ensaio nº 2: Incubação de células com extractos de resinas	50
2.1 Resumo de resultados	50
2.2 Processamento estatístico dos resultados	51
• Resina TEC	52
• Resina FBF	53
• Controlo negativo	54
• Correlação entre a concentração do tóxico e a viabilidade celular	56
• Citotoxicidade comparativa entre resinas	57
IV. DISCUSSÃO	61
V. CONCLUSÕES	73
VI. BIBLIOGRAFIA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura nº 1 - Esquema da estrutura química das moléculas de Bis-GMA, TEGDMA e UDMA, componentes das resinas compostas	14
Figura nº 2 - Esquema simplificado duma reacção de polimerização que une unidades individuais numa cadeia polimérica, remanescendo alguns monómeros residuais no processo.	15
Figura nº 3 - Classificação de preparações cavitárias (Classes de Black)	16
Figura nº 4 - Cavidade dentária profunda (5 mm) na qual a 3M™ ESPE anuncia a possibilidade de preenchimento com a resina composta Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) com um só incremento, de forma mais rápida do que com as resinas convencionais.	17
Figura nº 5 - Representação das técnicas de aplicação de RC. (Da esquerda para a direita) Técnica incremental usada na aplicação de RC convencionais; Técnica monobloco de 2 passos das RBF fluidas com a adição duma camada oclusal convencional; Técnica monobloco recomendada para aplicação de RBF mais consistentes.....	18
Figura nº 6 - Fórmula estrutural do fotoiniciador Ivocerin® da RBF TEC.....	20
Figura nº 7 - Esquema do efeito do fotoiniciador Ivocerin® na melhoria do alcance de polimerização, aumentando de 2 para 4 mm de espessura máxima de resina.....	21
Figura nº 8 - Esquema dos caminhos que os iões ou as substâncias eluídas das restaurações dentárias (R) podem percorrer durante a degradação para a cavidade oral (OC), dentina (D), câmara pulpar (P), periodonto (PD) e tecido periapical ou ósseo (PA).....	24
Figura nº 9 - Inflamação gengival adjacente a uma restauração dentária (Classe V de Black) com uma resina composta.	25
Figura nº 10 - Esquema da redução do MTT a formazan pela enzima mitocondrial desidrogenase succínica	30
Figura nº 11 - Resina composta Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®) e Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE)	33

Figura nº 12 - Fibroblastos 3T3 com prolongamentos citoplasmáticos estrelados característicos aderidos ao frasco de cultura, visualizadas ao MO (objectiva 10X). À esquerda: A) 1 dia após descongelação; à direita: B) 3 dias após passagem, com confluência de +/- 80%	35
Figura nº 13 - Câmara de Neubauer.....	40
Figura nº 14 - Células na câmara de Neubauer observadas ao MO, ampliação 100x ..	40
Figura nº 15 - Esquema duma câmara de Neubauer observada ao MO. Realce para as células presentes no conjunto de 16 quadrados periféricos.	40
Figura nº 16 - Molde metálico com 5 poços cilíndricos de 4 mm de diâmetro por 4 mm de profundidade, usado na confecção dos espécimes de resina.....	41
Figura nº 17 - Esquema representativo da montagem do material para preparação dos espécimes de resinas. De cima para baixo: placa de vidro, matriz de acetato, molde metálico com 5 poços cilíndricos de 4 por 4 mm, matriz de acetato, placa de vidro.....	42
Figura nº 18 - Fotopolimerizador de alta intensidade Elipar™ DeepCure-S LED (3M, ESPE). Intensidade: 1470 mW/cm ² (-10%/+20%); comprimento de onda: 430-480 nm.....	43
Figura nº 19 - Fluxo de trabalho do ensaio de citotoxicidade MTT, segundo ISO 10993-5, Anexo C.....	46
Figura nº 20 - Espectrofotómetro leitor de microplacas, modelo 680 (BioRad®)	47
Figura nº 21 - Exemplo duma placa após ensaio de optimização da concentração de células a usar na investigação, transcritos para a Tabela nº 9.....	49
Figura nº 22 - Fotografia da placa de 96 poços após incubação das células por 24h com os extractos de resina e solubilização dos cristais de formazan com DMSO, imediatamente antes da análise espectrofotométrica.....	51
Figura nº 23 - Alterações morfológicas das células 3T3 observadas ao MO após 24 de contato com FBF nas concentrações de 100% e 50%, comparando com anatomia normal dos fibroblastos usados no controlo negativo (objectiva 10x).....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela nº 1 - Tabela-resumo das características dos materiais testados neste estudo...	34
Tabela nº 2 - Indicações de uso das resinas compostas TEC e FBF.....	34
Tabela nº 3 - Reagentes biológicos usados neste estudo.....	36
Tabela nº 4 - Equipamentos laboratoriais.....	37
Tabela nº 5 - Intensidade da luz de polimerização e tempo recomendados pelos fabricantes de cada resina usada.....	42
Tabela nº 6 - Sumário das diluições de tóxico testadas.....	44
Tabela nº 7 - Esquema da distribuição das concentrações de cada extracto de resina a testar numa placa de 96 poços.....	44
Tabela nº 8 - Esquema da distribuição dos volumes de cada extracto de resina a testar numa placa de 96 poços.....	45
Tabela nº 9 - Resultados de absorvência por espectrofotometria do ensaio de optimização do número de células.....	49
Tabela nº 10 - Resultados da leitura de absorvência no espectrofotómetro - ensaio nº2: Incubação de células com extractos de resina.....	50
Tabela nº 11 - Médias de absorvência de cada resina nas diferentes concentrações testadas.....	52
Tabela nº 12 - Teste de Normalidade – aplicado à resina TEC.....	52
Tabela nº 13 - Teste de Normalidade – aplicado à resina FBF.....	53
Tabela nº 14 –Teste de normalidade – aplicado ao CN.....	54
Tabela nº 15 - Comparação dos valores de viabilidade celular, em percentagem, entre as duas resinas testadas em cada concentração, contra o valor do controlo negativo.....	55
Tabela nº 16 - Teste de efeitos entre sujeitos e respectiva significância estatística.....	56
Tabela nº 17 - Citotoxicidade das resinas TEC e FBF para todas as diluições.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico nº 1 - Resina TEC: Valores de absorvência (eixo Y) em cada concentração (eixo X) (valores referentes à Tabela nº 11). Estão representados os valores máximos, mínimos, médias e distribuição das amostras entre cada variável.....	53
Gráfico nº 2 - Resina FBF: Variância dos valores de absorvência (eixo Y) em cada concentração (eixo X) testada (valores referentes à Tabela nº 11).....	54
Gráfico nº 3 – <i>Boxplot</i> da absorvência do grupo CN.....	55
Gráfico nº 4 – Gráfico linear representativo da relação da concentração das resinas TEC e FBF (eixo X) na viabilidade celular (eixo Y), expressa em margens marginais	56
Gráfico nº 5 - Avaliação da toxicidade das resinas testadas para a diluição 1:1. Estes resultados correspondem aos valores de morte celulares descritos na Tabela nº 17.....	58
Gráfico nº 6 - Avaliação da toxicidade das resinas testadas para a diluição 1:2. Estes resultados correspondem aos valores de morte celulares descritos na Tabela nº 17.....	59
Gráfico nº 7 - Comparação gráfica da toxicidade das resinas nas mesmas concentrações	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1xC – Solução concentrada uma vez
- 3T3 – Células NIH/3T3 (ATCC®CRL-1658™)
- $\lambda_{\text{máx}}$ – Lambda máximo
- μl – Microlitros
- μm – Micrómetros
- °C – Graus centígrados
- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- ATCC – American Type Culture Collection (Manassas, EUA)
- AUDMA – Uretano Dimetacrilato aromático
- Bis-EMA – Bisfenol – A- Etil Metacrilato
- Bis-GMA – Bisfenol - A Glicidil Metacrilato
- CDUEM – Clínica Dentária Universitária Egas Moniz
- COX-2 – Ciclo-oxigenase-2
- C/ml – Número de células por mililitro
- cm^2/ml – Centímetro quadrado por mililitro
- CN – Controlo negativo
- CP – Controlo positivo
- CQ – Canforoquinonas
- DC – *Degree of conversion*; grau de conversão
- DMSO – Dimetilsulfóxido (Merck, EUA)
- DMEM/F12 - *Dulbecco's modified Eagle Medium nutrient mixture F-12 Ham*
- DDDMA – 1,12-Dodecano Dimetacrilato
- ED₅₀ – *Effective dose 50*
- EDMAB – Etil-4-N,N-dimetilaminobenzoato
- HEMA – Hidroxietil Metacrilato
- HPLC – *High performance liquid chromatography*; Cromatografia líquida de alta eficiência
- FBS – *Fetal Bovine Serum* (Sigma, EUA)
- FBF – Resina composta Filtek™ Bulk Fill Posterior Restorative Material (3M™ ESPE)
- IBM SPSS Statistics – International Business Machines, Statistical Package for Social Sciences (versão 23.0, Nova Iorque, EUA)
- ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

- ISO – *International Organization Standardization*
- LED – *Light Emitting Diode*
- máx – Máximo
- MO – Microscópio Óptico Invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA)
- MTT – Brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma, Reino Unido)
- min – minutos
- mg/ml – miligramas por mililitro
- mM – milimolares
- MSDS – Material Safety Data Sheet
- mW/cm² – miliwatts por centímetro quadrado
- nm – nanómetros
- P – Número da passagem celular
- p – *p-value* (valor-p); Sig.; valor de probabilidade de significância
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Gibco, Reino Unido); Tampão-fosfato salino
- R1 – Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill, Ivoclar Vivadent[®] – cor IVA (Universal)
- R2 – Filtek[™] Bulk Fill Posterior Restorative Refill, 3M[™] ESPE - cor A2
- RBF – Resinas compostas *Bulk Fill*
- RC – Resinas compostas
- ROS – *Reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigénio
- rpm – rotações por minuto
- seg – segundos
- Sig. – Significância estatística (p)
- TEC – Resina composta Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill (Ivoclar Vivadent[®])
- TEGDMA – Trietileno Glicol Dimetacrilato
- T25 – frasco de cultura celular de 25 cm²
- UDMA – Uretano Dimetacrilato
- U/ml – unidades por mililitro
- UV – Raios ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

Durante várias décadas, a amálgama foi o material de eleição para restaurações de dentes posteriores devido à sua efectividade e baixo custo. No entanto, o mercúrio libertado pelas amálgamas é perigoso para o doente e para o ambiente, o que levou à procura de outros tipos de materiais. As resinas compostas (RC) tornaram-se progressivamente uma alternativa estética às amálgamas para a restauração dentária. (Rasines Alcaraz et al., 2014).

1. Resinas Compostas

As resinas compostas têm sido usadas de forma ampla e bem-sucedida em Medicina Dentária. As resinas são muito versáteis e por serem utilizadas em restauração directa definitiva ou provisória, como material de confecção de coroas, *inlays* e *onlays*, bases cavitárias, selantes de fissuras, cimentação de peças protéticas, selamento endodôntico e de dispositivos ortodônticos, etc., têm tendência a serem utilizadas cada vez mais frequentemente (Jack L. Ferracane, 2011). Actualmente, as resinas são o material restaurador que melhor cumpre os pré-requisitos de elevada estética e durabilidade, preservando o dente afectado por lesões de cárie, reabilitando a sua função e aparência. As resinas permanecem na cavidade oral muito tempo e por isso devem ter propriedades mecânicas comparáveis às do esmalte e dentina (Kusgoz et al., 2011). As preocupações a nível da biocompatibilidade dos materiais dentários não se restringem apenas aos componentes da amálgama, mas também aos materiais mais recentes, nomeadamente os materiais à base de resina que, devido ao seu uso crescente, requerem uma avaliação científica do seu impacto nos sistemas biológicos. A polimerização incompleta dos monómeros e o desgaste das resinas permite a libertação de monómeros que são tóxicos para o organismo, logo as resinas não são totalmente inertes no ambiente oral (Geurtsen, 2000; Van Landuyt et al., 2011) ou, por outras palavras, a biocompatibilidade das resinas não é total.

Geurtsen (2000) declara que “a biocompatibilidade de um material restaurador dentário à base de resina é predominantemente determinado pela quantidade e natureza das substâncias orgânicas libertadas”, logo, pela sua composição.

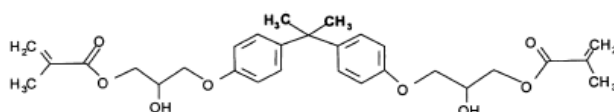
1.1 Composição

Os compósitos de resina são todos constituídos por uma matriz orgânica polimérica tipicamente à base de metacrilatos e partículas de carga inorgânica, unidos por um agente de união, o silano; além disso, as resinas também têm como constituintes um sistema iniciador e modulador da reação de polimerização e aditivos (catalisadores, pigmentos).

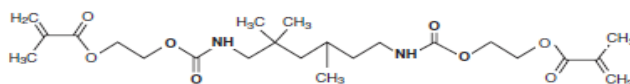
O monómero típico constitutivo da matriz orgânica é o bisfenol glicidil metacrilato (Bis-GMA ou monómero de Bowen), patenteado em 1962 por Ray. L. Bowen. A este monómero adicionam-se muitas vezes monómeros de baixa viscosidade como uretano dimetacrilato (UDMA), hidroxietil metacrilato (HEMA) e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) (Figura nº 1) para o tornar mais fluido e manuseável clinicamente, surgindo em várias formulações conforme a marca comercial (Peutzfeldt, 1997).

As partículas de carga são geralmente vidros radiopacos de vidro de óxido de zircónio, de sílica e alumínio, adicionadas à matriz que melhoram as propriedades físicas finais da resina, conferindo consistências diferentes conforme a distribuição, composição e tamanho dessas partículas. Quanto maior a percentagem de partículas de carga, mais forte, duro, resistente, viscoso e translúcido é o material, e menor a contracção e expansão durante a reação de polimerização.

Bis-GMA



TEGDMA



UDMA

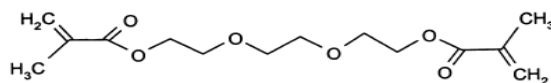


Figura nº 1 - Esquema da estrutura química das moléculas de Bis-GMA, TEGDMA e UDMA, componentes das resinas compostas. (Adaptada de: Anusavice et al., 2013)

A polimerização da maioria das RC é activada por luz, sendo o sistema iniciador mais comum as canforoquinonas (CQ), acelerada por amins terciárias. As CQ iniciam a reacção de polimerização ao absorver energia no espectro de luz visível e as amins terciárias são catalisadores dessa reacção. As resinas fotopolimerizáveis contêm CQ e requerem para iniciar a polimerização uma exposição à luz visível na gama de cor azul (450-495 nm), à qual as CQ são mais reactivas (espectro de absorção de luz das CQ: 390-510nm), num pico de sensibilidade aos 470 nm (Ivoclar Vivadent, 2004; Jack L. Ferracane, 2011).

1.2 Reacção de polimerização e monómeros residuais

As RC são, portanto, formadas por moléculas de baixo-peso molecular, chamadas “monómeros”, que através duma reacção fotoquímica se unem resultando numa macromolécula polimérica. Desta forma, permitem uma modelação da restauração dentária, apenas adquirindo uma forma definitiva sólida depois de polimerizadas, o que contribui largamente para o sucesso deste material em Medicina Dentária (Anusavice, Phillips, Shen, & Rawls, 2013).

A conversão de monómero a polímero não ocorre na totalidade (Figura nº 2), remanescendo alguns monómeros residuais que não sofrem ligações entre si, tendo sido observado um grau de conversão entre 55-80% (Üşümez, Büyükyilmaz, Karaman, & Gündüz, 2005).

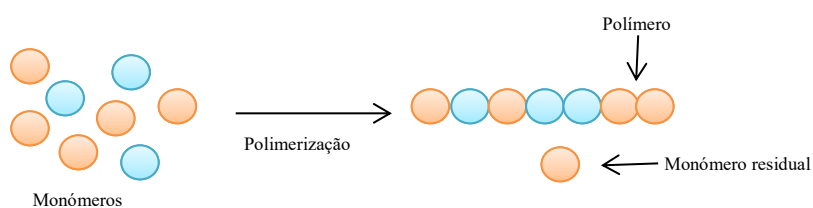


Figura nº 2 - Esquema simplificado duma reacção de polimerização que une unidades individuais numa cadeia polimérica, remanescendo alguns monómeros residuais no processo.

Desta forma, verifica-se uma relação inversa: quanto mais eficaz a reacção de polimerização e maior o grau de conversão (DC: *degree of conversion*), menor a disponibilidade de monómeros residuais (Rueggeberg & Craig, 1988).

1.3 Propriedades físicas

A citotoxicidade das RC pode ser influenciada tanto pela sua composição como pelo grau de conversão dos monómeros, pelo que é importante garantir uma polimerização das RC o mais completa possível (Caughman, Caughman, Shiflett, Rueggeberg, & Schuster, 1991), ou seja reduzindo a presença de compostos residuais não firmemente agregados na malha polimérica que conseqüentemente podem libertar-se. Dos Santos et al. (2014) corrobora esta conclusão, afirmando que o grau de conversão (DC) de um compósito determina a sua biocompatibilidade. Uma incompleta conversão dos monómeros da matriz de resina pode provocar a sua eluição para a cavidade oral e zona pulpar, sendo um factor determinante tanto nas propriedades físicas como na biocompatibilidade do produto (Ferracane, 1994; Regina, Archegas, Rached, & Ignacio, 2009; dos Santos et al., 2014; Lempel et al., 2014;).

Apesar dos grandes avanços tecnológicos, ainda há algumas desvantagens relativamente às propriedades físico-mecânicas das RC, que condicionam o seu desempenho e longevidade, nomeadamente a limitada profundidade de polimerização (Sakaguchi et al., 1992) e o reduzido grau de conversão (DC) dos monómeros (J L Ferracane & Greener, 1986; Galvão, Caldas, Bagnato, de Souza Rastelli, & de Andrade, 2013).

Leprince, JG. (2012) caracteriza os factores condicionantes do DC final de um compósito dentário: factores intrínsecos como a estrutura química dos monómeros e o tipo e concentração do fotoiniciador; e factores extrínsecos como as condições de polimerização. Relativamente a este último factor, dado que a energia da luz de polimerização desce drasticamente ao atravessar a superfície dum compósito, levando à

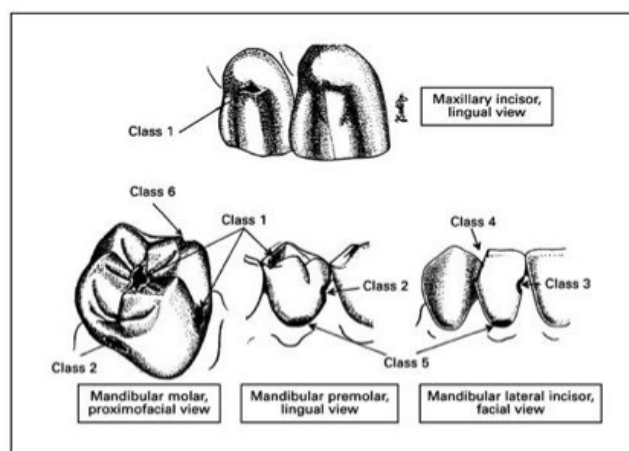


Figura nº 3 - Classificação de preparações cavitárias (Classes de Black) (Adaptada de: Summitt, 2013)

redução do DC (Price, Murphy, & Dérand, 2000), tem sido convencionalmente recomendada a aplicação em camadas até 2 milímetros (mm) de espessura, seguida de incidência de luz de polimerização adequada, repetindo estas operações as vezes necessárias até ao preenchimento total da cavidade (Malhotra,

Kundabala, & Shashirashmi, 2010; Park et al., 2008; Pilo, Oelgiesser, & Cardash, 1999; Soh, Yap, & Siow, 2004), principalmente em cavidades grandes de classe II de Black que requerem incrementos de resina mais espessos. Esta técnica de aplicação em camadas finas, denominada “incremental”, foi desenvolvida como um meio de reduzir o factor “C” (Factor “C” é a relação entre as superfícies aderidas/superfícies não aderidas da restauração às paredes da cavidade). Quanto maior o factor C numa cavidade (classe I = Factor 5), maior a tensão gerada após polimerização.

Esta técnica é geralmente aceite como a estratégia que permite uma adequada penetração da luz, e conseqüentemente, uma polimerização mais eficiente, tal como a redução das tensões da contração de polimerização do material (Malhotra et al., 2010; Obici et al., 2006; Versluis, Douglas, Cross, & Sakaguchi, 1996), minimizando lesões de cárie secundárias, possibilidade de formação de desadaptações internas (Jack L. Ferracane, 2011; Hilton & Ferracane, 1999), fracturas dentárias e redução das propriedades mecânicas do material (Corral Núñez, Camila; Vildósola Grez, Patrício; Miranda, Cristian Bersezio; dos Campos, Edson Alves; Fernández Godoy, 2015). Deste modo, várias aplicações são necessárias para finalizar a restauração, especialmente em caso de cavidade extensas, o que se torna um processo demorado (Furness, Tadros, Looney, & Rueggeberg, 2014); aumenta o risco de inclusão de bolhas de ar e, portanto, de falha coesiva entre camadas, para além da possibilidade de contaminação entre elas (Flury, Hayoz, Peutzfeldt, Hüslér, & Lussi, 2012; Pilo et al., 1999).

Recentemente, para ultrapassar estes problemas, uma nova geração de RC surgiu no mercado, conhecida como “resinas compostas *Bulk Fill*” (RBF) (Nicoleta Ilie & Hickel, 2011). Os fabricantes alegam que este material dispensa o uso da técnica incremental, pois pode ser colocado numa única camada ou monobloco, como o próprio nome indica (“Bulk”= bloco; “Fill”= preenchimento) (Leprince, P. et al., 2013) (Figura nº 4).

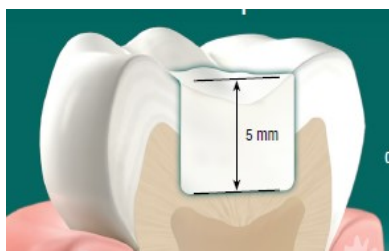


Figura nº 4 - Cavidade dentária profunda (5 mm) na qual a 3M™ ESPE anuncia a possibilidade de preenchimento com a resina composta Filtek Bulk Fill com um só incremento, de forma mais rápida do que com as resinas convencionais. (<http://multimedia.3m.com/mws/media/9845920/filtek-bulk-fill-posterior-restorative-overview-brochure.pdf>)

1.4 Resinas Compostas *Bulk Fill* (RBF)

- **Classificação**

Em 2009, foi lançada a RC SureFil® SDR® Flow (Dentsply Caulk), a primeira RC a proclamar a vantagem de poder ser aplicada em camadas de 4 mm (máx) em vez dos 2 mm usados habitualmente com as outras resinas (Dentsply International, 2009-2010).

A partir daqui, outras foram aparecendo como por exemplo a Filtek™ Bulk Fill Flowable (3M™ ESPE) usada neste estudo que, tal como a primeira, apresenta uma consistência fluida (*flowable*), pelo que está “indicada como base cavitária em classes I e II de Black, requerendo uma camada adicional de 2 mm de RC convencional na superfície oclusal” (3M ESPE, 2015; Núñez, Camila et al, 2015). Só mais tarde foram desenvolvidas RBF com consistência idêntica à das convencionais, dispensando a necessidade da camada oclusal extra com outro material, de que é exemplo a RBF Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®), usada neste estudo (Ivoclar Vivadent, 2004). O terceiro tipo de RBF requer uma peça manual sónica especial para a sua activação que provoca uma vibração sónica baixando momentaneamente a viscosidade da RBF ao aplicá-la. Temos como exemplo a SonicFill™ (Kerr), indicada também em classes de Black I e II em camadas até 5 mm (Núñez, Camila et al, 2015).

Estes materiais são classificados de acordo com a sua consistência e técnica de aplicação (Figura nº 5). Em suma, temos as RBF *flowable* usadas como bases de cavidades, as *flowable* com activação sónica utilizadas em restaurações directas e as RBF de viscosidade regular também utilizadas como material restaurador directo sem necessidade duma camada superficial convencional (embora seja aconselhada por motivos estéticos) (Núñez, Camila et al, 2015).



Figura nº 5- Representação das técnicas de aplicação de RC. (Da esquerda para a direita) Técnica incremental usada na aplicação de RC convencionais; Técnica monobloco de 2 passos das RBF fluidas com a adição duma camada oclusal convencional; Técnica monobloco recomendada para aplicação de RBF mais consistentes. (Adaptada de: Núñez, Camila et al; 2015)

- **Propriedades**

O desenvolvimento das RBF trouxe muitas vantagens relativamente às convencionais, tornando-se imediatamente um produto atractivo apesar dos poucos estudos clínicos existentes. As restaurações com RBF são mais fáceis e rápidas do que as convencionais efectuadas através da técnica incremental em cavidades grandes. Podem ser colocadas em camadas até 4 mm de uma só vez com adequada profundidade de polimerização, poupando tempo de consulta (Alrahlah, Silikas, & Watts, 2014; Benetti, Havndrup-Pedersen, Honoré, Pedersen, & Pallesen, 2014; Li, Pongprueksa, Van Meerbeek, & De Munck, 2015). Segundo as conclusões duma avaliação conduzida pela American Dental Association (ADA) sobre dez RBF, todas apresentam valores de profundidade de polimerização iguais ou maiores do que os requeridos pelas normas ISO 4049:2009 (“ISO 4049:2009”) (Tiba et al., 2013). As RBF têm contracções e tensões induzidas pela polimerização menores do que as resinas compostas convencionais, ao mesmo tempo que mantêm equiparável eficiência de polimerização a 4 mm (El-Damanhoury & Platt, 2014). No estudo de Fronza et al. (2015), FBF e SureFil® SDR® Flow (Dentsply International) demonstraram ter graus de conversão uniformes em todas as profundidades testadas, incluindo 3 e 4 mm, ou seja, apresentam uma profundidade de polimerização e um grau de conversão de monómero eficazes à espessura em que são colocados, solucionando os problemas normalmente inerentes ao uso das RC convencionais, pelo que são uma alternativa “fácil, rápida e conveniente na restauração de cavidades dentárias posteriores profundas”, como concluiu Akah, Daifalla, & Yousry (2016). Além disso, colocar a RBF em monobloco evita a inclusão de bolhas de ar entre camadas (Par, Gamulin, Marovic, Klaric, & Tarle, 2015), evitando falhas nas propriedades mecânicas da restauração. Mesmo colocadas a 4mm, têm um comportamento clínico tão efectivo quanto as RC colocadas de forma incremental (van Dijken & Pallesen, 2016).

Contudo, considerando que a luz de polimerização atravessará uma faixa mais espessa, o surgimento das RBF tem também levantado algumas questões, como a capacidade de serem adequadamente polimerizadas em profundidade (Núñez, Camila et al, 2015). Os fabricantes contra-argumentam que este material apresenta maior translucidez na cor, permitindo maior transmissão de luz (Bucuta & Ilie, 2014). Por outro lado, alterou-se a formulação dos materiais de forma a modular a reacção de polimerização, incluindo monómeros que podem aliviar as tensões induzidas pela contracção de polimerização, o

uso de fotoiniciadores mais reactivos, e a incorporação de partículas de carga de diferentes tipos, tal como “pré-polímeros” (Fronza et al., 2015).

- **Composição**

A composição das RBF é comparável à das RC convencionais (R Z Alshali, Satterthwaite, Silikas, Salim, & Sung, 2015; N Ilie, Bucuta, & Draenert, 2013). Não obstante, o conteúdo de carga inorgânica destas resinas é geralmente menor do que as RC convencionais nanohíbridas e microhíbridas, sendo normalmente materiais mais fluidos, “comparáveis às RC convencionais *flowable* em termos de percentagem em volume de carga inorgânica, mas maior em percentagem de peso”. Esta característica é relevante porque a diminuição na quantidade de carga inorgânica permite uma penetração de luz mais profunda, ao reduzir a diferença do índice de refração entre as partículas de carga e a matriz orgânica (Ilie, N et al., 2013).

Mais especificamente, outras características da resina Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill (TEC) (Ivoclar Vivadent[®]) contribuem para a vantagem de aumento de translucidez e respectivo aumento de polimerização em profundidade: as partículas de carga inorgânica são mais pequenas (40-3000 nm), sendo considerado um material nanohíbrido (Jack L. Ferracane, 2011; Ivoclar Vivadent, 2004).

Além disso, a TEC possui um sistema fotoiniciador patenteado mais reactivo à luz de fotopolimerização do que as tradicionais CQ ($\lambda_{\text{máx}}= 468 \text{ nm}$) presentes nas RC, requerendo assim uma menor exposição à radiação para uma polimerização eficaz, denominado “Ivocerin[®]” ($\lambda_{\text{máx}}= 418 \text{ nm}$) (Figuras nº 6 e 7) (Yaser Issa, Watts, Boyd, & Price, 2016).

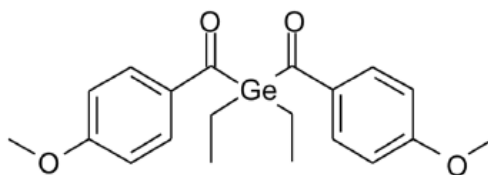


Figura nº 6 - Fórmula estrutural do fotoiniciador Ivocerin[®] da RBF TEC.

(Adaptada de: “Ivoclar Vivadent. Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill, Scientific Documentation. 2004)

A resina TEC possui um terceiro tipo de fotoiniciador (para além das CQ e Ivocerin[®]), Lucirin TPO[®] ($\lambda_{\text{máx}}= 385 \text{ nm}$) que, em associação com os anteriormente referidos, dá a esta resina um amplo espectro de absorção, em vários comprimentos de onda da luz de

polimerização, o que se traduz supostamente numa maior eficiência de conversão (DC). Já a resina FBF não possui Lucirin TPO[®] nem Ivocerin[®], podendo prever-se que luz com comprimentos de onda mais baixos possa não polimerizar tão eficazmente a resina (Yaser Issa et al., 2016).

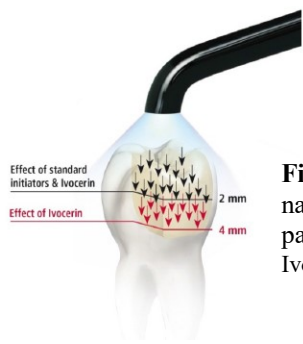


Figura nº 7 – Esquema do efeito do fotoiniciador Ivocerin[®] na melhoria do alcance de polimerização, aumentando de 2 para 4 mm de espessura máxima de resina. (Adaptada de: Ivoclar Vivadent, 2004)

Para evitar a contracção de polimerização associada ao incremento em camadas de 4 mm, a Ivoclar Vivadent[®] desenvolveu um pré-polímero denominado “Isofiller”, constituído por dimetacrilatos já pré-polimerizados e partículas de carga, que contribui para o alívio do *stress* da contracção de polimerização. A introdução do “Isofiller” reduz a contracção de polimerização ao permitir que a maioria da contracção ocorra antes da polimerização da restauração. Assim, evita a formação de fractura marginal, lesões de cárie secundárias e hipersensibilidade. (Ivoclar Vivadent, 2004).

“As RC à base de metacrilatos têm uma tendência inerente para contrair durante a polimerização e o grau varia de acordo com os monómeros usados”. A FBF refere a inclusão de dois novos monómeros (relativamente ao equivalente convencional da marca) de elevado peso molecular, o DDDMA e AUDMA (para além do UDMA), que ajudam a controlar a contracção volumétrica inerente à contracção de polimerização das RC, ao mesmo tempo que reduzem a viscosidade do monómero Bis-GMA (3M ESPE, 2015), fundamentando deste modo a possibilidade de incrementos em blocos de maior espessura sem acusar danos apesar do aumento do factor “C”.

Em suma, para manter as propriedades físicas adequadas deste novo material, os fabricantes modulam a sua composição ou outras características. Mas há que ter em conta que alguns estudos têm demonstrado repetidamente que mesmo mudanças muito pequenas na composição ou processamento dum material são capazes de alterar a sua biocompatibilidade. Deste modo, é crucial que os médicos-dentistas consultem a *Material Safety Data Sheet* (MSDS) do produto, embora nem todos os componentes

potencialmente alergénios sejam listados (apenas os principais), nem há certeza de que os que são enumerados possuem a concentração exacta, reivindicando segredo da marca (“trademark secret”) (Anusavice et al., 2013).

- **Controvérsia**

Alguns estudos indicam que nem todas as resinas *Bulk Fill* atingem uma polimerização aceitável à profundidade de 4 mm. Por exemplo, um estudo de Pongprueksa et al. (2015) avaliou a taxa de eluição dos monómeros residuais em relação ao seu grau de conversão em três tipos de resinas diferentes, incluindo a Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) (FBF), comparando a técnica incremental com a “*bulk fill*”. Conclui-se que o DC à profundidade de 4 mm foi ligeiramente menor aplicando a técnica de restauração em monobloco (“*bulk fill*”), reflectindo-se efectivamente numa taxa de eluição de monómeros significativamente maior relativamente ao método convencional. Lempel et al. (2016) provou que FBF não atingiu a 4 mm o mesmo nível de DC no fundo do espécime que o respectivo compósito convencional (Filtek Ultimate Flow) a 2 mm. Mas também conclui que “os compósitos fluidos convencionais demonstram maior eluição de monómeros do que as RBF” (excepto FBF).

Já outro estudo discorda, afirmando que a eluição nas RBF é comparável à das RC convencionais, apesar do seu aumento em espessura (Ruwaida Z. Alshali, Salim, Sung, Satterthwaite, & Silikas, 2015).

Noutro estudo recente de Fronza et al. (2015), FBF foi testada apresentando uniforme e adequado DC a 4 mm, enquanto o DC da resina TEC ia reduzindo com o aumento de profundidade. A mesma redução na microdureza foi verificada no estudo de Flury et al. (2014) na TEC com o aumento de espessura, mantendo-se constante na FBF e noutras RBF. Fronza et al. (2015) dizem, referindo-se inclusivamente a Flury et al. (2012), que “muitos estudos apresentam conclusões favoráveis quanto ao DC das RBF”, através da medição da microdureza, contudo, esse método tem sido questionado pois sobrestima a profundidade de polimerização” (Flury et al., 2012). Outros métodos usados, no entanto, provam que há uma polimerização eficiente à profundidade indicada pelo fabricante, incluindo TEC e FBF (Alrahlah, Silikas, & Watts, 2014; Núñez et al., 2015). A microdureza da superfície das RBF após armazenamento em meio salivar artificial,

simulador dos solventes da dieta, não mostrou resultados inferiores aos das RC convencionais (Sunbul, Silikas, & Watts, 2016).

As diferenças encontradas nos vários estudos *in vitro* quanto aos diferentes parâmetros avaliados nas RBF justificam a continuação dos estudos sobre estes produtos relativamente recentes no mercado. O presente estudo visa somar à controversa literatura mais dados sobre a biocompatibilidade de duas RBF.

As preocupações com este material em particular prendem-se que pelo facto de permitir uma colocação em camada mais espessa ser geralmente colocado em cavidades grandes, junto da câmara pulpar. Devido à proximidade da polpa e tecidos gengivais, é necessário estudar a citotoxicidade das RBF de modo a evitar efeitos prejudiciais sobre os tecidos biológicos. Hanks, Craig, Diehl, & Pashley (1988) mostraram num estudo com quatro RC que os seus componentes extraídos em meio aquoso difundiam através da dentina (0,5 mm de espessura), causando nas primeiras 24h uma resposta citotóxica nas células pulpares. Felizmente, a dentina oferece protecção moderada contra a toxicidade local com suficiente espessura. Em cavidades maiores, com menos dentina remanescente, à profundidade de 4 mm, a penetração da luz de polimerização pode ficar comprometida e provocar redução de conversão de monómeros a polímero (DC), resultando na eluição duma elevada taxa desses monómeros residuais para a cavidade oral e câmara pulpar. Se estes monómeros não forem biocompatíveis podem induzir reacções locais ou sistémicas (Hume & Gerzina, 1996).

2 Biocompatibilidade

“A coexistência de materiais manufacturados com tecidos corporais e fluidos que devem permanecer no organismo humano, por períodos de tempo variados, sem irritar os tecidos moles” (Vital, 2008) tem sido motivo de preocupação crescente na literatura científica. A biocompatibilidade é geralmente definida como a ausência de interacção entre o material e o hospedeiro quando exerce a sua função específica, no entanto, o conceito evoluiu no sentido em que se reconhece que ocorrem interacções mútuas entre eles, resultando numa resposta biológica equilibrada (J. C. Wataha, 2001). A interacção depende da conjugação de vários factores: do material, do hospedeiro e do ambiente ou condições a que é sujeito o material (Vital, 2008).

2.1 Propriedades biológicas das resinas compostas e interacção com o periodonto

No que diz respeito aos materiais usados na cavidade oral, incluindo os restauradores, não existe um que seja totalmente seguro. O critério de selecção assenta na suposição de que os benefícios do seu uso devem ultrapassar largamente os conhecidos riscos a ele associados. Paracelsus (1493-1541), um físico suíço, afirmou algo que ainda é actualmente um princípio da Toxicologia: “Todas as substâncias são venenosas. Não há nenhuma que não seja um veneno. A dose certa diferencia um veneno dum remédio” (Anusavice et al., 2013).

Muitos materiais usados na cavidade oral apresentam componentes potencialmente tóxicos ou irritantes, o que leva a afirmar que talvez nenhum deles seja completamente inerte em termos biológicos. As resinas compostas deveriam, idealmente, ser inodoras, insalubres, não tóxicas nem irritantes, isto é, inofensivas na cavidade oral, e portanto, insolúveis em meio salivar ou noutra qualquer fluido ingerido (Anusavice et al., 2013). No entanto, mesmo após polimerização permanecem monómeros não ligados que são extraídos rapidamente pelos solventes da dieta ou saliva, principalmente nas primeiras 24h, tendo sido relatadas perdas de massa até 2% dos compósitos (J.L. Ferracane, 1994). A segregação dos seus componentes pode ocorrer devido a um incompleto DC de monómero logo após a polimerização, mas também por degradação e erosão da restauração ao longo do tempo (Geurtsen, 1998). Este desgaste pode ser acelerado por reacções químicas catalisadas pelas esterases salivares na presença de moléculas de água que penetram na rede polimérica (Göpferich, 1996).

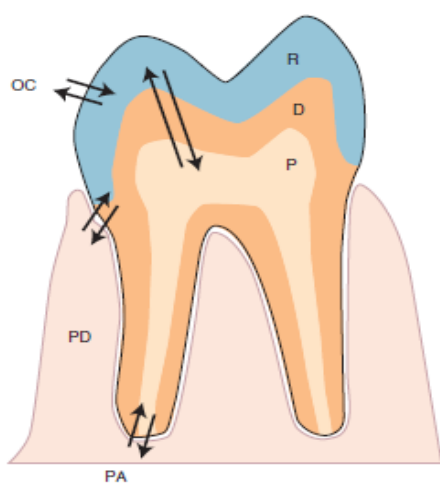


Figura nº 8 - Esquema dos caminhos que os iões ou as substâncias eluídas das restaurações dentárias (R) podem percorrer durante a degradação para a cavidade oral (OC), dentina (D), câmara pulpar (P), periodonto (PD) e tecido periapical ou ósseo (PA) (Adaptada de: Anusavice et al., 2013).

A partir da restauração, as substâncias eluídas difundem-se, tal como ilustra a Figura nº 8, atingindo diversos tecidos orais, como o tecido pulpar, periodontal, ápex radicular, gengiva, língua e mucosa oral. A sua acumulação resultará eventualmente em reacções adversas locais ou sistémicas, classificando-se em tóxicas, alérgicas, inflamatórias e mutagénicas (Anusavice et al., 2013) e, nesse caso, o material não poderá ser considerado biocompatível. Os efeitos adversos dependerão da toxicidade do irritante, da concentração que atingirá no tecido, do tempo de exposição e da resposta tecidular (Grimsdottir & Hensten-Pettersen, 1993). A quantidade de monómeros eluídos e, portanto, a biocompatibilidade de um material dependem de factores tão diversos como o DC, a composição química orgânica e inorgânica, bem como as respectivas proporções, a espessura do espécime, a porosidade e o tipo de solvente (da Silva, Almeida, Poskus, & Guimarães, 2008).

Muitos autores confirmam a referida eluição dos componentes das RC, alguns dos quais comprovando também a respectiva toxicidade em fibroblastos pulpares e gengivais humanos ou mamíferos (Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, 1990; Moharamzadeh, Van Noort, Brook, & Scutt, 2007; Paranjpe, Bordador, Wang, Hume, & Jewett, 2005; Tadin, Marovic, Galic, Kovacic, & Zeljezic, 2014). Al-Fawaz, Gerzina, & Hume (1993) demonstraram que as células pulpares podem sofrer efeitos citotóxicos após a penetração dos monómeros HEMA e Bis-GMA na câmara pulpar, sugerindo a sua migração através nos túbulos dentinários. Chang et al. (2014) demonstrou que também o monómero UDMA tem capacidade de redução da viabilidade de células pulpares (29-



Figura nº 9 - Inflamação gengival adjacente a uma restauração dentária (Classe V de Black) com uma resina composta. Cortesia de Dr. Hyun-Ju Chung. (Adaptada de: Anusavice et al., 2013)

49%), apoptose, indução de alterações morfológicas, bem como paragem do ciclo celular e estimulação da produção da COX-2, indutor da inflamação.

A literatura científica há largos anos que fortifica a evidência da toxicidade do comonómero TEGDMA. Foi verificado que pode induzir a solubilização da bicamada lipídica das membranas celulares (Fujisawa, Kadoma, & Komoda, 1988) levando à morte celular. Além disso, o aumento da produção de

espécies reactivas de oxigénio (ROS), inibidores do equilíbrio *redox* e viabilidade celulares, e também a diminuição rápida dos níveis intracelulares de glutathione, antioxidante protector contra ROS, são outros mecanismos descritos envolvidos no processo de apoptose provocada pelo TEGDMA, UDMA e HEMA, representando um sinal precoce de outras alterações citotóxicas. Pode inclusivamente verificar-se aberrações metabólicas em concentrações muito inferiores às necessárias para provocar apoptose (Samuelson, Dahl, Karlsson, Morisbak, & Becher, 2007; Volk, Engelmann, Leyhausen, & Geurtsen, 2006). Estes monómeros, ao potenciarem a produção da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), parecem ser factores críticos na resposta inflamatória dos materiais resinosos que os contêm (Figura nº 9) (Lee, Kim, Lim, Lee, & Yang, 2009). Uma resposta inflamatória poderá representar clinicamente recessão gengival, derivada da apoptose dos fibroblastos do periodonto (Mitic et al., 2013). Por outras palavras, deverá haver mais propensão para recessão gengival nas áreas em que exista acumulação de produtos irritativos para os tecidos periodontais. Sobretudo, em restaurações sub-gengivais. Foi demonstrado que a apoptose dos fibroblastos gengivais está aumentada de forma significativa em caso de gengivite e doença periodontal (Arce, Tamayo, & Cortés, 2007).

ED₅₀ (*Effective Dose* 50) representa a quantidade de tóxico que mata 50% duma população, neste caso 50% das células. Num estudo comparativo, Bis-GMA, monómero-base

constituente

das RC, é considerada a molécula mais citotóxica (ED₅₀= 0,08-0,14 mM), seguindo-se UDMA (ED₅₀= 0,06-0,47 mM) e TEGDMA (ED₅₀= 0,12-0,26 mM) e HEMA. Pelo contrário, DDDMA, (ED₅₀> 5,0 mM), constituinte da FBF usada neste estudo, de entre os metacrilatos presentes nas resinas testadas é o menos citotóxico, ainda menos do que o fotoiniciador CQ (ED₅₀= 2,17-2,40 mM) (Geurtsen, 2000).

A mais alta concentração de Bis-GMA (1332,7 µm) e de Bis-EMA (3428,0 µm) foi encontrada na TEC no estudo de Cebe et al. (2015) que compara várias resinas, incluindo FBF, nos períodos de 24h, 30 dias e 1h, concentrações capazes de provocar reacções adversas na polpa humana. Segundo Hume & Gerzina (1996), microgramas dos monómeros HEMA e TEGDMA podem ser encontrados no filme salivar em

minutos a horas após a colocação de resinas compostas, enquanto que via dentina e polpa em horas a alguns dias.

Para além da citotoxicidade, reacções genotóxicas e efeitos estrogénicos também têm sido relatados como consequência da libertação dos componentes resinosos (Darmani & Al-Hiyasat, 2006; Visalli et al., 2012). A resina FBF possui um componente possivelmente carcinogénico para os humanos por inalação, de acordo com a IARC (International Agency for Research on Cancer), dióxido de titânio, embora não em quantidade suficiente para ser expectável esse efeito. Segundo a MSDS, a toxicidade aguda provocada por este composto poderá ocorrer por meio dermatológico, ingestão ou inalação. As moléculas constituintes da TEC, Bis-GMA, Bis-EMA e UDMA são todas consideradas mutagénicas e alergénicas (Geurtsen, 2000).

No campo das RBF, os estudos *in vitro* têm-se multiplicado. Cebe et al. (2015) concluíram na sua investigação que monómeros residuais, nomeadamente Bis-GMA, TEGDMA, HEMA e Bis-EMA, foram extraídos de seis diferentes RBF, aumentando a sua concentração ao longo do tempo. Nesse mesmo estudo, as quantidades de Bis-EMA e Bis-GMA eluídos da TEC foram maiores do que as das outras RBF. Entretanto, no estudo de Lempel et al. (2016), entre todos os materiais testados FBF demonstrou ter uma eluição de UDMA 20 vezes superior à observada noutras resinas.

No que concerne especificamente à citotoxicidade das RBF, Toh, Yap, & Lim (2015) concluem que nem todas as RBF induzem citotoxicidade aceitável, ou seja, viabilidade celular >70 , à profundidade de 4 mm, apesar das instruções indicadas pelo fabricante, não podendo por isso ser consideradas biocompatíveis. Com algumas excepções, de forma geral, os eluados de RBF têm valores de viabilidade celular comparáveis ou até maiores do que os eluados de compósitos tradicionais. No entanto, nem todas as resinas apresentem níveis idênticos de toxicidade, se é que apresentam citotoxicidade.

O tema é controverso. Contudo, poucos estudos estão ainda disponíveis no que diz respeito à biocompatibilidade destes materiais, principalmente em situações *in vivo*, apesar da informação pertinente que nos poderiam proporcionar quanto ao seu desempenho clínico.

2.2 Testes de Biocompatibilidade

De forma a proteger os seres humanos de possíveis riscos para a saúde decorrentes do uso de dispositivos médicos, a *International Standard Organization* (ISO) definiu a norma 10993, que define vários métodos para uma avaliação biológica prévia. Para tal, existem vários testes disponíveis, de acordo com o tipo de material a testar, o seu objectivo de uso, local de utilização e duração de contacto, incluindo testes de genotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade sistémica, irritação local e citotoxicidade (ISO, 2008). Assim, os testes de citotoxicidade *in vitro* em particular estão regulamentados pela norma ISO 10993 - parte 5 (ISO 10993, 2009). Complementarmente, a norma ISO 7405 categoriza e regula a avaliação da biocompatibilidade dos materiais usados especificamente em Medicina Dentária.

A ISO recomenda a aplicação de vários testes *in vitro* e *in vivo*, de modo a inferir acerca da biocompatibilidade de um material, dado que o uso de apenas um deles seria insuficiente para tal, sendo importante a convergência de vários resultados (Vital, 2008).

O avanço rápido da tecnologia poderá ultrapassar facilmente a legislação existente para a avaliação. Com o aparecimento de novos materiais e métodos, novos testes de qualidade e crescentes exigências de segurança, os padrões devem ser revistos e actualizados frequentemente. É importante ter um olhar atento sobre os instrumentos e materiais dentários, sobretudo os mais recentes. É possível que materiais dentários que não cumprem os padrões de organizações como a ADA sejam vendidos a dentistas e consumidores porque, apesar do desenvolvimento de padrões de qualidade, “a decisão do fabricante de testar os seus produtos de acordo com os padrões nacionais e internacionais existentes é puramente voluntária” (Anusavice et al., 2013).

Existem três tipos de testes aplicados na medição da biocompatibilidade: *in vitro*, utilizando-se culturas de células, *in vivo*, utilizando-se experiências em animais e através de estudos clínicos (Anusavice et al., 2013; Vital, 2008).

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* constituem a primeira fase dos testes de biocompatibilidade, visando simular efeitos biológicas previamente ao contacto com os tecidos humanos. Por esse motivo, é-lhes reconhecido o valor que representam no sentido de entender as respostas biológicas. Qualquer resultado poderá ser útil no avanço do

conhecimento sobre o material avaliado: “Um resultado negativo demonstra que a quantidade não é suficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo”. Porém, não podemos imediatamente garantir a biocompatibilidade desse material; Por outro lado, um teste de citotoxicidade positivo pode indicar que o material em estudo integra alguma substância lixiviável e potencialmente prejudicial aos tecidos. São testes rápidos, sensíveis, económicos, controláveis e reprodutíveis, produzindo dados que permitem rejeitar precocemente um material tóxico. Estes testes *in vitro* têm também vantagem na simplicidade em termos éticos relativamente aos estudos *in vivo*, além de que permitem a possibilidade de comparar materiais exactamente sob as mesmas condições, o que não acontece numa situação clínica (Vital, 2008).

As directrizes indicam que o contacto das células/material poderá ser através de extractos ou eluados, por contacto directo ou indirecto (por meio de difusão em agar, por exemplo). O teste de extractos usado nesta investigação consiste na imersão de amostras do material de tamanho padronizado em meio de cultura, por não menos de 24h, se a 37°C. Durante este período, as substâncias eventualmente tóxicas difundem-se para o meio, e é este meio contendo o extracto do material que é colocado em contacto com as células em vez do próprio material. Nos testes em que os extractos são diluídos, é importante ter em mente que os resultados podem ser afectados por alguns factores: o tipo de meio de extracção, tempo e temperatura, o rácio entre a superfície do corpo de prova e o volume usado para a extracção. É igualmente relevante a existência de um controlo negativo e outro positivo na metodologia de todos os testes de citotoxicidade (Jorge, Giampaoli, & Pavarina, 2004; Vital, 2008).

- **Citotoxicidade – teste MTT**

Os testes de citotoxicidade podem ser usados em cultura de órgãos ou tecidos, embora os mais simples e usuais sejam executados em culturas celulares primárias ou em linhagens clonais permanentes já estabelecidas.

A razão para usar fibroblastos neste estudo está relacionada com o facto deste tipo celular integrar a constituição dos dentes e poder diferenciar-se noutros tipos de células dentárias como odontoblastos e cementoblastos, presentes na dentina e cimento, onde o material dentário é adicionado.

Para determinar a citotoxicidade de materiais à base de resina, têm sido usadas culturas celulares imortais de morfologia homogênea durante muitos anos. A ISO 10993-5 recomenda, entre outros, a linha celular 3T3 para a realização destes testes. Esta linha corresponde a fibroblastos de murganho.

Após contacto com um material potencialmente prejudicial, podemos analisar vários parâmetros celulares (quantitativos ou qualitativos), por exemplo a avaliar a actividade enzimática, a integridade membranar, o metabolismo celular (ADN ou síntese proteica), inibição do crescimento celular ou alterações morfológicas (Geurtsen, 2000; Jorge et al., 2004). De entre os testes usados, o ensaio MTT (Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma, Reino Unido), descrito por Mosmann em 1983, é um dos mais comuns para avaliar a toxicidade de um material com base no dano causado às células. Este teste baseia-se na medição do metabolismo celular, quantificando de forma colorimétrica a taxa de proliferação ou inibição do crescimento das culturas celulares após submetê-las ao tóxico a testar. A intensidade do sinal é proporcional à sobrevivência das células, logo, reflecte a citotoxicidade desse material.

O MTT é um sal de tetrazólio amarelo, hidrossolúvel, que possui na sua estrutura molecular um anel clivável por uma enzima mitocondrial, denominada desidrogenase succínica. As células metabolicamente activas incorporam e clivam a molécula de MTT, originando cristais de formazan de cor azul-violeta e insolúveis em água (Figura nº 10).

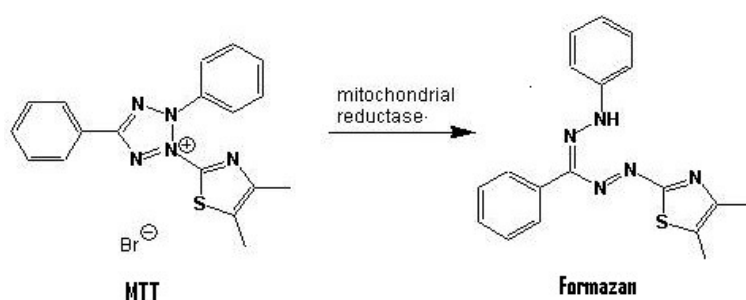


Figura nº 10- Esquema da redução do MTT a formazan pela enzima mitocondrial desidrogenase succínica (Adaptada de: Brescia & Banks, 2009).

Este produto de reacção deverá ser dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e a intensidade da cor final medida de forma exacta num espectrofotómetro leitor de microplacas, com um filtro de 595 nm. Tendo em conta que apenas as células vivas irão

catalisar esta reacção, podemos deduzir que a quantidade de formazan formado é proporcional à quantidade de células viáveis. Ou seja, a intensidade da cor será maior em caso maior viabilidade celular. O sinal estará reduzido quando há diminuição da taxa de sobrevivência celular, sendo este considerado citotóxico se houver morte celular >70% (ISO, 2009; Vitral, 2008).

Em resumo, este teste segue o princípio de que uma maior percentagem de morte celular na presença dos monómeros de materiais dentários apoia a hipótese de que estes podem ter um efeito citotóxico directo nos fibroblastos gengivais.

As vantagens do teste MTT são a rapidez com que se obtêm e processam resultados, de forma reprodutível e fiável. Sendo um ensaio colorimétrico, os resultados são de certa

forma visuais, o que se torna útil quando pretendemos uma análise quantitativa rápida (Vitral, 2008).

3 Objectivo

O objectivo deste estudo é comparar a biocompatibilidade de duas resinas compostas *Bulk Fill*, nomeadamente a resina Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) e Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®), usadas na restauração dentária, com base nas normas ISO 7405 (2008) e ISO 10993 (2009), de forma a verificar se a viabilidade celular é afectada pela presença das resinas, em função da concentração do produto.

4 Hipóteses experimentais:

As hipóteses nulas desta investigação são: a) Não há diferenças significativas na toxicidade das resinas testadas; b) A citotoxicidade das resinas não aumenta com o aumento da concentração dos extractos.

As hipóteses alternativas serão então: a) As resinas *Bulk Fill* apresentam níveis de toxicidade significativamente diferentes; b) A citotoxicidade das resinas aumenta com a concentração dos extractos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais:

1.1 Resinas compostas

Neste trabalho foram usados dois tipos diferentes de resinas compostas *Bulk Fill*, usadas na restauração dentária (Figura nº 11):

- Resina 1: Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill – Ivoclar Vivadent[®] (TEC)
- Resina 2: Filtek[™] Bulk Fill Posterior Restorative Material – 3M[™] ESPE (FBF)



Figura nº 11 - Resina composta Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill (Ivoclar Vivadent[®]) e Filtek[™] Bulk Fill (3M[™] ESPE) (<https://www.dentalmedical.eu/dental-practice/restoratives/composite/tetric-evoceram-bulk-fill/10380>; <https://www.dentalmedical.eu/dentalpractice/restoratives/composite/tetric-evoceram-bulk-fill/10380>)

A resina TEC é um material fotopolimerizável, nanohíbrido, restaurador das estruturas dentárias decíduas ou definitivas, de classes I, II e V de Black, bem como base cavitária, selante de fissuras e núcleos de coroas. Segundo as instruções do fabricante, pode ser colocado em camadas até 4 mm de espessura.

A resina FBF testada é um compósito fotopolimerizável fluido otimizado para restaurações directas de estruturas dentárias posteriores (pré-molares e molares) de forma mais simples e rápida, embora também possua como campos de aplicação indicados pelo fabricante restaurações anteriores, base cavitária, núcleos e restaurações indirectas. Segundo a 3M[™] ESPE, este produto induz poucas tensões de polimerização e é de cor opaca semi-translúcida, permitindo incrementos até 5 mm. Ao contrário dos outros materiais fluidos, a resina FBF não requer a sobreposição de uma RC convencional para garantir melhores propriedades mecânicas, embora seja aconselhado em classes I e II que sofrem maiores forças oclusais (3M ESPE, 2015). As características dos materiais seleccionados estão resumidas na Tabela nº 1 e as indicações de utilização na Tabela nº 2.

Tabela nº 1 - Tabela-resumo das características dos materiais testados neste estudo

Nome do produto	Fabricante	Lote	Abreviatura	Cor	Ingredientes*	Conteúdo de carga inorgânica por peso (volume)	Espessura recomendada (mm)	Tempo e intensidade de luz recomendados para polimerização	
Filtek™ Bulk Fill	3M™ ESPE	N727319	FBF	A2	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, DDDMA, AUDMA, EDMAB, diuretano dimetacrilato, procrilato, benzotriazol, vidros de cerâmica/sílica/zircónio silanizados, trifluoreto de itérbio, dióxido de titânio.	76,5% (58,4%)*2	4	550 – 1000 mW/cm ²	40 seg
								1000-2000 mW/cm ²	20 seg
Tetric EvoCeram® Bulk Fill	Ivoclar Vivadent®	S45466	TEC	IVA (Universal)	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, Pré-polímero, vidros de bário, trifluoreto de itérbio, aditivos, catalisadores, estabilizadores e pigmentos	76-77%*2 (53-54%)	4	500 mW/cm ²	20 seg
								1000 mW/cm ²	10 seg

* Segundo ficha MSDS de cada produto

*2 Segundo "Documentação Científica" do produto

Tabela nº 2 - Indicações de uso das resinas compostas TEC e FBF

	TEC	FBF
Indicações de uso	Restauração de dentes posteriores (classes I e II, incluindo a substituição de cúspides individuais);	Restaurações directas anteriores e posteriores (incluindo superfícies oclusais);
	Restauração de classes V (lesões de cárie cervicais, erosão radicular)	Base cavitária sob restaurações directas;
	Núcleos de coroas	Núcleos de coroas
	Selante de fissuras extensas em molares e pré-molares;	Restaurações indirectas, incluindo inlays, onlays e facetas;
	Restauração de dentes decíduos.	Restauração de dentes decíduos.

*2 Segundo "Documentação Científica" do produto de cada fabricante

1.2 Linha celular (3T3)

Uma cultura celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de murganho (ou camundongo), NIH/3T3 (ATCC[®]CRL-1658[™]), da American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), foi a usada neste estudo, visto ser um modelo celular de referência em testes *in vitro*.

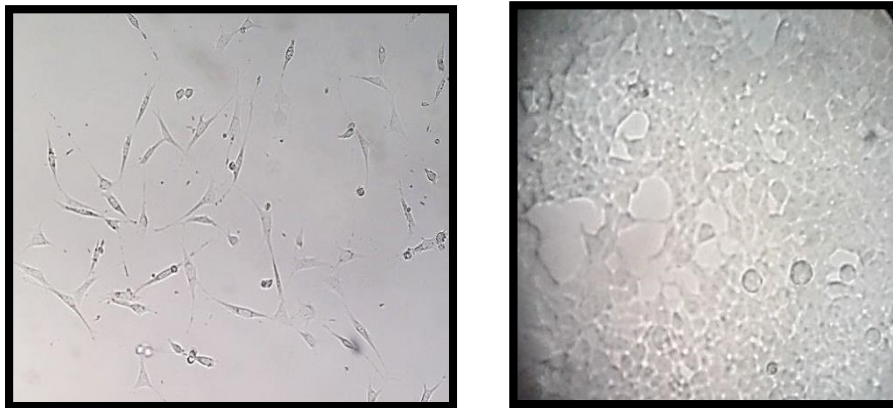


Figura nº 12 - Fibroblastos 3T3 com prolongamentos citoplasmáticos estrelados característicos aderentes ao frasco de cultura, visualizadas ao MO (Axiovert[®] 25, Zeiss, EUA) (objectiva 10X). À esquerda: A) 1 dia após descongelação; à direita: B) 3 dias após passagem, com confluência de 80%.

Esta é uma linha celular contínua, ou seja, as células reproduzem-se indefinidamente, tendo morfologia homogénea do tipo fusiforme, com núcleo central e prolongamentos citoplasmáticos típicos estrelados, como se vê na Figura nº 12.

Crescem em monocamada, o que facilita a visualização ao microscópio óptico invertido (MO) (Axiovert[®] 25, Zeiss, EUA). A linha celular 3T3 apresenta inibição de contacto, não é tumorigénica e tem características idênticas às das células normais (ATCC, 1925). A resposta citotóxica em linhas celulares primárias de humanos é comparável à das linhas celulares contínuas (Thonemann, Schmalz, Hiller, & Schweikl, 2002), de que é exemplo as células 3T3. A escolha dos fibroblastos para este ensaio deve-se ao facto de este ser o tipo celular mais comum na polpa dentária, “alvo” dos compostos químicos libertados pelos compósitos (J. Wataha, Lockwood, Bouillaguet, & Noda, 2003).

1.3 Reagentes e equipamentos

Os reagentes usados nesta investigação encontram-se descritos na Tabela nº 3 e os equipamentos na Tabela nº 4.

Tabela nº 3 - Reagentes biológicos usados neste estudo

Reagente	Fonte
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 0,5mg/ml, 99% puro	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Dimetilsulfóxido (DMSO), filtrado-esterilizado, 99% puro	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) (Meio <i>Eagle Dulbecco</i> modificado), filtrado-esterilizado, testado para endotoxinas	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> (Tampão-fosfato, PBS) 1xC, pH 6,0-7,0	Gibco, Londres, Reino Unido
<i>Fetal Bovine Serum Gold</i> (FBS); esterilizado, pH 7,1, testado para endotoxina e hemoglobina	PAA, Pasching, Áustria.
Gentamicina 50mg/ml	Gibco, Londres, Reino Unido.
NEM <i>Non-essential Amino Acid Solution</i> 100×; filtrado-esterilizado, testado para endotoxinas	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Solução <i>Tripan Blue</i> (0,4%) (Azul de tripano), filtrada-esterilizada	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Solução de Piruvato de Sódio 100 mM (PNA)	Gibco, Londres, Reino Unido
Solução de Anfoterizina B 250 µg/ml (Fungizona), filtrada-esterilizada	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Solução L-glutamina-penicilina-estreptomicina (200 mg L-glutamina, 10000 U/ml Penicilina, 10 mg/ml Estreptomicina), filtrada-esterilizada (pen-strep-glu)	Gibco, Londres, Reino Unido
Tripsina de pâncreas suíno 1xC, filtrado-esterilizado, pH 6,4-7,0	Sigma-Aldrich, Londres, Reino Unido
Água destilada estéril (autoclavada)	

Tabela nº 4 - Equipamentos laboratoriais

Equipamentos laboratoriais	Fonte
Balança de precisão M-Power, modelo AZ214	Sartorius™, Goettingen, Alemanha
Câmara de fluxo laminar <i>Mars Safety Class 2</i>	LaboGene™, Lynge, Dinamarca
Centrifugadora 3-16PK	Sigma®, Londres, Reino Unido
Câmara de Neubauer, modelo 8100104	Hirschmann Neubauer-Improved®, Estugarda, Alemanha
Criotubos	DentaLab™, Madrid, Espanha
Espátula de metal	Asa Dental, Luca, Itália
Estufa incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO ₂ <i>Water Jacketed</i>	Shel Lab™, Cornelious, EUA
Filtros de celulose com poros de 45 µm	Whatman®, Nova Jersey, EUA
Frascos de cultura de 25 cm ² (T25)	Sarstedt®, Nümbrecht, Alemanha
Leitor de microplacas, modelo 680	BioRad®, Califórnia, EUA
Micropipetas P10 e P100 e pontas estéreis	Gilson®, Middleton, EUA
Microscópio óptico invertido	Axiovert® 25, Zeiss, EUA
Pipeta multicanal BPE-300	Labnet International®, Nova Jersey, EUA
Placa de 96 poços	VWR International®, Xangai, China
Tubos <i>Eppendorf</i> de 2 ml	DentaLab™, Madrid, Espanha
Tubos <i>Falcon</i> 15ml e 50 ml	DentaLab™, Madrid, Espanha

2. Métodos

Neste trabalho foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* de extractos de duas resinas bulk fill – os ensaios de MTT, utilizando concentrações diferentes de cada extracto.

2.1 Preparação das culturas celulares

O presente estudo foi desenvolvido nas instalações do Departamento de Biologia Molecular do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, nomeadamente na sala de cultura de células. De maneira a evitar eventuais contaminações biológicas nas culturas de células que podem alterar os resultados dos ensaios de toxicidade, todos os procedimentos laboratoriais de manipulação de células, uso de reagentes ou materiais de teste decorreram de forma asséptica, manuseando instrumentos esterilizados na câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene™, Lynge, Dinamarca), previamente

desinfetada com álcool a 70% e após incidência de luz ultravioleta (UV). Os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave (121°C, 30 min.) ou obtidos comercialmente estéreis.

Verificou-se que as culturas se encontravam livres de *Mycoplasma sp.*, em conformidade com os requisitos da ISO 10993 - parte 5 (ISO 10993, 2009), já que a sua presença poderia influenciar os resultados por induzir alterações celulares independentes das variáveis em estudo. A confirmação da ausência de micoplasmas foi determinada por amplificação do ADN através de um PCR, utilizando *primers* específicos para o ADN de micoplasma, seguido de análise dos fragmentos de ADN por electroforese em gel de agarose 1%.

- **Descongelamento**

As células NIH/3T3, guardadas a -80°C, foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C, centrifugadas e, seguidamente, ressuspensas em 6 ml de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo, num frasco de cultura de 25 cm² (T25) (Sarstedt[®], Nümbrecht, Alemanha).

O meio de cultura DMEM completo é constituído por DMEM simples suplementado em laboratório com 10% de soro FBS, 1% NEM 100X; 1% de solução filtrada de L-glutamina 200 mg, 10000 U/ml (unidades por mililitro) de Penicilina, 10 mg/ml (miligramas por mililitro) de Estreptomicina (pen-strep-glu); 1% de solução de Anfotericina B 250 µg/ml (Fungizona); 1% PNA mM (unidades de milimolar); 0,5% Gentamicina 50 mg/ml.

O frasco foi colocado numa atmosfera 100% humidificada com 5% de CO₂ por 24h, para que as células tivessem as condições necessárias para sobreviver e proliferar e aderissem ao pavimento. No dia seguinte, observam-se muitas células redondas que não ficaram aderentes, que correspondem a células que morreram durante o processo de congelação. O meio de cultura foi substituído, por pipetagem, retirando as células mortas e deixam-se as células aderentes proliferar por mais uns dias até atingir uma confluência de cerca de 80%.

- **Subculturas**

A prática das subculturas evita que a concentração das células ultrapasse a capacidade do meio de cultura evitando a paragem da proliferação. Quando cerca de 80% do fundo do frasco está coberto por células aderentes em monocamada, é necessário efectuar-se uma passagem (P) para outro frasco de cultura T25, de forma a perpetuar a proliferação celular (subculturas). Para tal, remove-se o meio de cultura do poço com uma pipeta de 5 ml, lavam-se as células com 3 ml de tampão fosfato salino PBS (1xC) e, de seguida, pipetam-se 1,5 mL de uma solução de tripsina (1xC), enzima hidrolítica das glicoproteínas da matriz extracelular que medeiam a adesão das células ao fundo do frasco. Colocam-se os frascos com as células, durante dois minutos na estufa incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO₂ Water Jacketed (Shel LabTM, Cornelious, EUA), a 37°C, temperatura óptima de actuação da enzima. Após confirmar ao MO invertido, que as células descolaram do fundo do frasco, pipeta-se 3 ml de meio DMEM suplementado para o poço (duplicando o volume de tripsina usado ou mais), para inibir a reacção de tripsinização, misturam-se bem os reagentes com uma pipeta e transporta-se o volume total (4,5 mL) para um tubo tipo *Falcon* de 15 mL (*Falcon* 15) (DentaLabTM, Madrid, Espanha). Centrifuga-se 3 minutos a 1000 rotações por minuto (rpm) na Centrifugadora 3-16PK (Sigma, Londres, Reino Unido). Decorrido esse tempo, descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se o *pellet* de células em 2 ml de DMEM completo, pipetando para cima e para baixo a mistura.

O volume a plaquear num novo T25 com 6 ml de meio completo é calculado de acordo com o dia em que se pretende fazer o ensaio do MTT. Tendo em conta que o ciclo de reprodução desta linha celular em particular é de 24h +/-, plaqueando 250 µl de inóculo de células, juntamente com 6 mL de meio completo, é expectável que ao fim de 3 dias as células estejam confluentes. A tripsinização das culturas celulares foi efectuada normalmente a cada três dias, isto é, duas vezes por semana.

Após este procedimento, coloca-se o frasco na estufa pelo tempo necessário, indicando o número da passagem P. Para os ensaios MTT nº 1 e nº 2, as células encontravam-se entre as passagens P10-P15.

2.2 Ensaio nº 1: Otimização do nº de células para o ensaio MTT

- **Contagem de células**

Usando uma câmara de Neubauer (Hirschmann Neubauer-Improved[®], Estugarda, Alemanha) (Figura nº 13), contam-se ao MO as células vivas refringentes de uma amostra da solução nos 4 conjuntos periféricos de 16 quadrados da câmara de contagem (Figuras nº 14 e 15).



Figura nº 13 - Câmara de Neubauer. (Adaptada de: http://produto.mercadolivre.com.br/MLB-690399546-camara-de-neubauer-dupla-melhorada-espelhada-_JM)

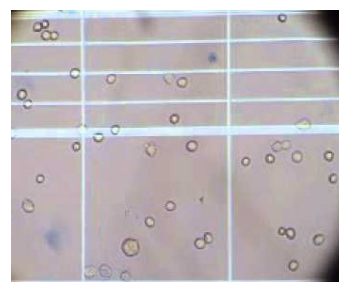


Figura nº 14 - Células na câmara de Neubauer observadas ao MO, ampliação 100x (Adaptada de: <https://www.youtube.com/watch?v=Z1aVQFRUv8M>)

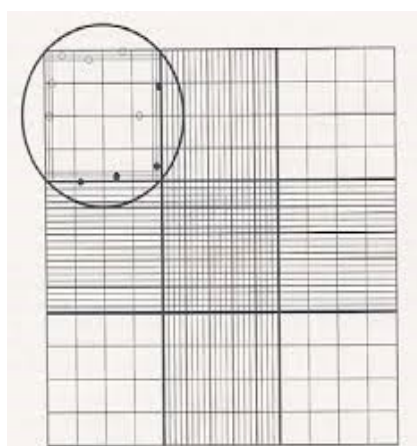


Figura nº 15 - Esquema duma câmara de Neubauer observada ao MO. Realce para as células presentes no conjunto de 16 quadrados periféricos. (Adaptada de: http://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf)

A amostra contém 10 µl de uma solução de azul de tripano (0,4%) e 10 µl de células ressuspensas. O número de células por mililitro (C/ml) na suspensão original obtém-se a partir da seguinte fórmula:

$$C/ml = (n^{\circ} \text{ de células contadas por quadrante}/4) \times (1/2^{-1}) \times (1/10^{-4} \text{ ml}),$$

em que 2^{-1} corresponde à diluição do azul de tripano e 10^{-4} ml é o volume dum conjunto de 16 quadrados da câmara de contagem (volume total da câmara de Neubauer).

De acordo com o número de células calculado por mililitro, foram colocados nos poços de uma placa de 96 poços os volumes correspondentes às concentrações de 4×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 células/ml.

Aguardou-se um período de 48h, após o qual se realizou o ensaio de MTT (descrito abaixo) cujos resultados são obtidos por leitura da absorvância a 595 nm num espectrofotómetro.

Foram testadas várias concentrações de células para determinar qual o nº de células, não expostas a tóxicos, que após o ensaio de MTT tem valores de concentração à volta de 1, valor limite para o qual a lei de Lambert-Beer é válida, isto é, que apresenta linearidade entre os valores de absorvância e o número de células vivas

Este procedimento foi repetido 3 vezes.

2.3 Preparação das resinas

O presente estudo avalia a citotoxicidade de duas resinas compostas:

- Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill – Ivoclar Vivadent[®]
- Filtek[™] Bulk Fill – 3M[™] ESPE

No 1º dia do ensaio MTT foram preparadas as amostras. O protocolo de preparação dos espécimes foi executado em condições de assepsia, com instrumentos esterilizados ou desinfectados com *spray* de álcool a 70%, conforme o tipo, e uso de luvas de látex, tal como indicado nas normas ISO 10993- Parte 12: “Preparação de amostras e materiais de referência” (2009).

Para cada resina, foram preparados 10 espécimes (n=10) através de um molde metálico com 5 poços cilíndricos de 4 mm de diâmetro por 4 mm de altura (Figura nº 16), montando o material de acordo com o esquema da Figura nº 17.



Figura nº 16- Molde metálico com 5 poços cilíndricos de 4 mm de diâmetro por 4 mm de profundidade, usado na confecção dos espécimes de resina.

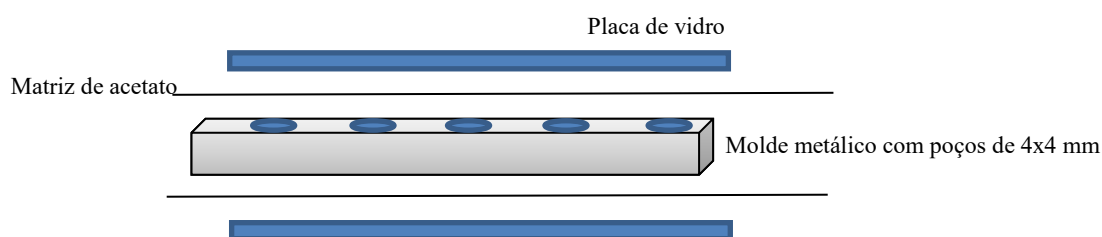


Figura nº 17 - Esquema representativo da montagem do material para preparação dos espécimes de resinas. De cima para baixo: placa de vidro, matriz de acetato, molde metálico com 5 poços cilíndricos de 4 por 4 mm, matriz de acetato, placa de vidro.

De forma a garantir uma base com uma superfície lisa e simular uma classe I de Black, foi colocada uma placa de vidro sob o molde metálico e, entre eles, uma matriz de acetato (Figura nº16).

Depois, foi preenchido cada poço com um único incremento, com o auxílio duma espátula angulada e brunidor esférico, e removido o excesso de material antes da polimerização com outra placa de vidro por cima do molde para obter uma superfície uniforme.

Foi confirmada a intensidade pretendida para este estudo ($1000-1200\text{mW}/\text{cm}^2$) do fotopolimerizador a cada 5 utilizações com um radiómetro. O fotopolimerizador foi colocado o mais próximo possível do espécime. Cada espécime foi fotopolimerizado individualmente, através duma matriz de acetato colocada por cima da resina, com o fotopolimerizador LED (*Light Emitting Diode*) de alta intensidade Elipar DeepCure S (3M™ ESPE, Canada) (Figura nº 18), durante o tempo recomendado pelo fabricante para a intensidade usada (Tabela nº 5):

Tabela nº 5 - Intensidade da luz de polimerização e tempo recomendados pelos fabricantes de cada resina usada.

Resina	Intensidade da luz	Tempo
TEC	1000 mW/cm^2	10 seg
FBF	1000-2000 mW/cm^2	20 seg



Figura nº 18 - Fotopolimerizador de alta intensidade Elipar™ DeepCure-S LED (3M, ESPE). Intensidade: 1470 mW/cm² (-10%/+20%); comprimento de onda: 430-480 nm (Adaptada de: www.3m.com)

Após a polimerização, cada espécime foi retirado do molde, protegido da luz ambiente durante a execução dos restantes e, posteriormente, desinfectado com *spray* de álcool a 70 % antes de ser submerso em meio de cultura DMEM completo, o líquido de extracção, dentro de tubos *Eppendorf* de 2 ml. A proporção área do cilindro de resina/volume de meio deverá ser 3 cm²/ml, segundo as directrizes da ISO 10993-12, o que significa que 5 discos de resina deverão ser submersos em 1,25 ml DMEM. Os materiais de teste foram armazenados numa estufa a 37°C, durante 24h. Todos os cilindros de resina das amostras foram preparadas no mesmo dia e colocadas em meio de cultura para permitir a eluição do material não polimerizado das resinas a extrair no mesmo dia. Os materiais a testar e as células incubadas na placa de Wells foram armazenados ao mesmo tempo, embora separadamente, tendo decorrido 24h de incubação.

2.4 Ensaio nº 2: Determinação da viabilidade celular

- **Incubação de células com extractos de resina às 24h**

Os extractos (descritos no ponto anterior) foram então recolhidos no final dum período de 24h e filtrados com filtros de poros de 45 µm de diâmetro (Whatman®, Nova Jersey, EUA). Após isso, foram diluídos com meio DMEM de forma a obter concentrações de tóxico de 100%, 50% e 10% para cada resina, conforme ilustrado na Tabela nº 6 abaixo.

Tabela nº 6- Sumário das diluições de tóxico testadas

Concentração	Extracto (µl)	DMEM (µl)	Total no poço (µl)
100% (Diluição1/1)	100	0	100
50% (Diluição1/2)	50	50	100
10% (Diluição1/10)	10	90	100

Após a obtenção das diluições pretendidas, procedeu-se à incubação nos respectivos poços da placa de 96 poços (previamente incubados com fibroblastos 3T3 na concentração otimizada no ensaio nº1), de acordo com as Tabelas nº 7 e nº 8. Cada concentração testada foi replicada 8 vezes (filas A-H), de forma a estabelecer validade estatística e científica.

Tabela nº 7 - Esquema da distribuição das concentrações de cada extracto de resina a testar numa placa de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 50	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
B	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
C	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
D	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
E	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
F	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
G	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
H	DMEM	CP	R1 - 100	R1 - 50	R1 - 10	R2 - 100	R2 - 100	CN	CN	CN	DMEM	Vazio

Legenda: DMEM: meio de cultura; CP: controlo positivo; R1 – 100: Extracto da resina TEC na concentração 100%; R1 – 50: Extracto da resina TEC na concentração 50%; R1 – 10: Extracto da resina TEC na concentração 10%; R2 – 100: Extracto da resina FBF na concentração 100%; R2 – 50: Extracto da resina FBF na concentração 50%; CN: controlo negativo; Vazio: poço não utilizado neste ensaio.

Tabela nº 8 - Esquema da distribuição dos volumes de cada extracto de resina a testar numa placa de 96 poços.

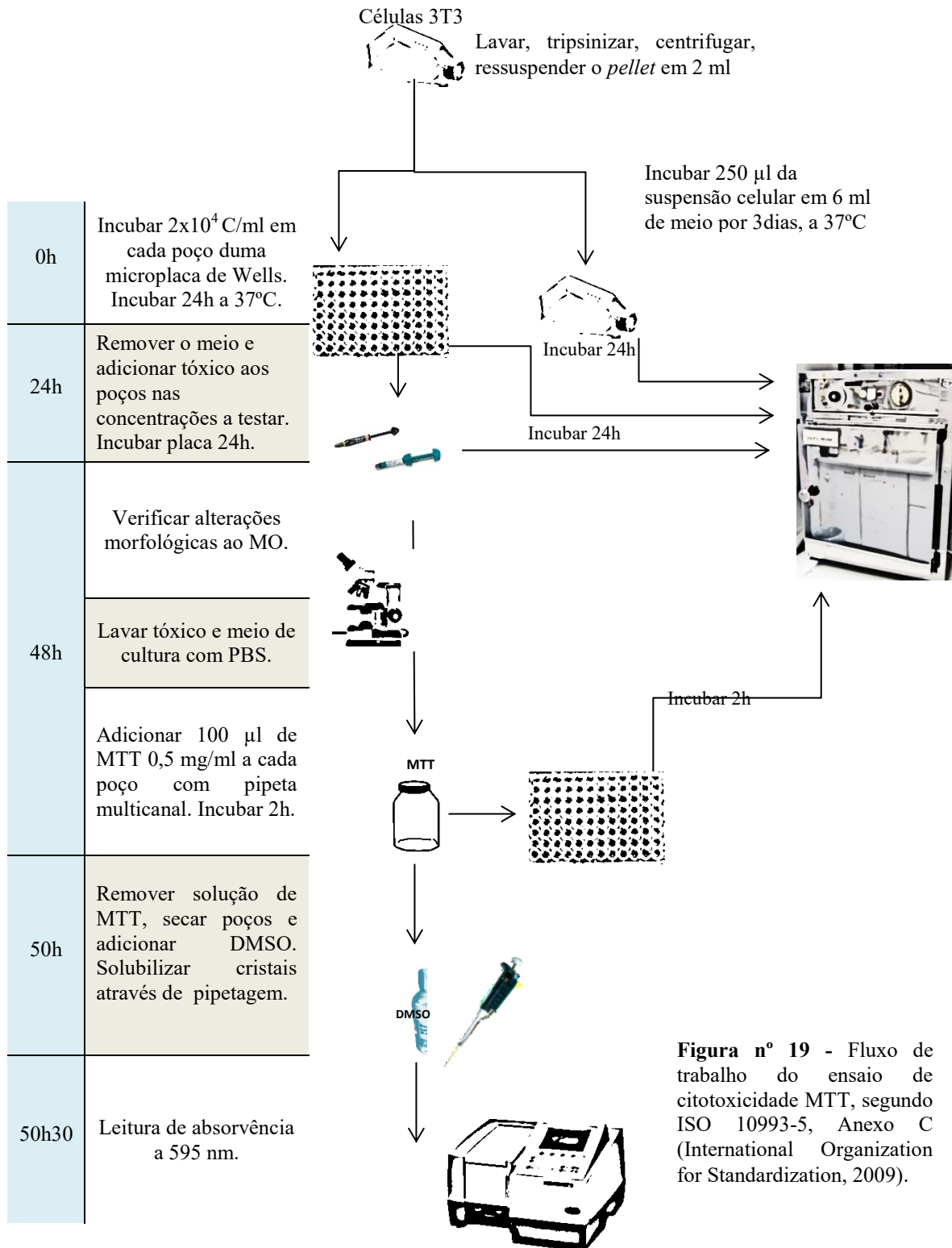
Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Produto	DMEM	CP	R1	R1	R1	R2	R2	CN	CN	CN	DMEM	-
Volume tóxico por poço (µl)	0	50	100	50	10	100	50	0	0	0	0	0
Volume DMEM por poço (µl)	100	50	0	50	90	0	50	100	100	100	100	0
Volume total por poço (µl)	100											0
Volume total por coluna (µl)	800											0
Células/ml	-	1x10 ⁴									-	-

Uma coluna foi usada como controlo positivo (CP) da experiência (coluna nº 2), contendo 50 µm de etanol 70% e 50 µm de DMEM; outras três como controlo negativo (CN) contendo 100 µm de DMEM completo (nº8, 9 e 10); duas colunas contêm apenas DMEM (branco) sem células (nº 1 e 11).

- **Determinação da viabilidade celular - Ensaio MTT**

O método usado para quantificar a taxa de proliferação ou inibição do crescimento das culturas celulares após submetê-las aos tóxicos a testar foi o ensaio MTT, cujo esquema de trabalho está sumarizado na Figura nº 19.

Decorridas 24h de exposição ao tóxico (3º dia do ensaio MTT), foi removido o meio por inversão de placa em papel esterilizado e lavados os poços com 100 µl de meio de cultura simples por pipetagem. Foram adicionados de seguida 100 µl da solução MTT por poço à concentração de 0,5 mg/mL, dissolvido em DMEM completo, tendo o cuidado de não expor à luz ambiente este reagente foto-reactivo. Colocou-se a placa na estufa durante 2h. Depois, removeu-se a solução de MTT e secaram-se os poços através da inversão da placa, com absorção do líquido através de papel. Este procedimento deve ser cuidadoso para evitar que os cristais de formazan resultantes da actividade das células vivas se descolem do fundo, enviesando os resultados colorimétricos e as conclusões do estudo. Posteriormente foi adicionado 100 µl de DMSO por poço, misturando bem com a micropipeta com a intenção de solubilizar os cristais de formazan sem, no entanto, criar bolhas que alteram a leitura no espectrofotómetro.



Após este passo, colocou-se a placa num leitor de microplacas (BioRad, Califórnia, EUA) (Figura nº 20), que mede por espectrofotometria a absorvência ao comprimento de onda 595 nm.



Figura nº 20 - Espectrofotómetro leitor de microplacas, modelo 680 (BioRad®) (Adaptada de: <http://www.bio-rad.com/en-us/product/model-680-microplate-reader>)

As células incubadas em meio de cultura sem agentes tóxicos correspondem ao CN e deverão apresentar a coloração mais intensa. A média dos valores de absorvância destas colunas corresponde a 100% de viabilidade celular. Uma vez que absorvância do CN corresponde a 100% de viabilidade, a percentagens das restantes deverá ser calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{média dos valores de absorvância das células em contacto com o tóxico}}{\text{média dos valores de absorvância das células do grupo de controlo}} \times 100$$

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente com recurso ao *software* SPSS (IBM SPSS Statistics, versão 23.0, Nova Iorque, EUA). Os testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram usados para comprovar a normalidade das variáveis contínuas; Seguidamente, o teste paramétrico ANOVA-*one-way* (análise univariada de variância) analisou de forma comparativa as variáveis em estudo: resinas e concentração. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando *p-value* < 0,05.

III. RESULTADOS

1. Ensaio n° 1: Optimização do número de células a incubar

Como referido na secção anterior, o 1º ensaio destinava-se à determinação do número de células a adoptar no ensaio n° 2. As células presentes em cada poço de uma placa com 96 poços, em diferentes quantidades por coluna foram submetidas a todo o procedimento do teste de MTT descrito no material e métodos. Após solubilização dos cristais de formazan criados na reacção de redução do MTT, observámos tonalidades de intensidade crescente por coluna, conforme expectável (Figura n° 21).

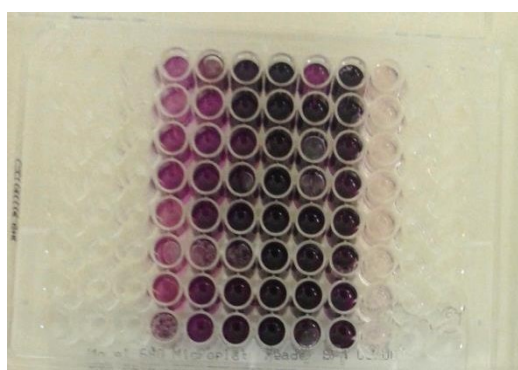


Figura n° 21 – Exemplo duma placa de 96 poços após ensaio de optimização da concentração de células a usar na investigação, transcritos para a Tabela n° 9. As concentrações usadas foram: 4×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 células/ml.

Tabela n° 9 - Resultados de absorvência por espectrofotometria do ensaio de optimização do número de células

[células]	Branco	4×10^3	5×10^3	1×10^4	2×10^4	3×10^4
Coluna	1	2	3	4	5	6
Linha						
A	0,192	0,298	0,172	0,794	1,165	1,671
B	0,112	0,276	0,304	0,57	1,32	1,507
C	0,107	0,223	0,308	0,588	1,176	1,56
D	0,106	0,185	0,186	0,522	1,098	1,41
E	0,092	0,309	0,287	0,608	0,993	1,426
F	0,091	0,234	0,275	0,41	0,807	1,388
G	0,298	0,355	0,156	0,341	0,817	1,305
H	0,094	0,318	0,213	0,36	0,793	1,477
Média	0,1365	0,27475	0,237625	0,524125	1,021125	1,468
Média – branco	0	0,13825	0,101125	0,387625	0,884625	1,443

Os resultados de absorvência obtidos por espectrofotometria encontram-se na Tabela nº 9 (e Figura nº 21). Após análise destes resultados, verificou-se que a quantidade de células/ml que dão origem os valores mais elevados de absorvência dentro da linearidade da Lei de Lambert-Beer é de 2×10^4 células/ml, tendo sido esta concentração adoptada para os próximos estudos de viabilidade celular.

2. Ensaio nº 2: Incubação de células com extractos de resina

2.1 Resumo de resultados

O ensaio nº 2 visava a avaliação da citotoxicidade das resinas FBF e TEC, e permite a comparação da citotoxicidade de ambas. Após solubilização dos cristais de formazan com DMSO, cada um dos poços da placa de 96 apresentava diferentes tonalidades para as diferentes resinas e concentrações dos extratos postos em contacto com as células (Figura nº 22). Os valores de absorvência estão indicados na Tabela nº 10.

Tabela nº 10- Resultados da leitura de absorvência no espectrofotómetro - ensaio nº 2: Incubação de células com extractos de resina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	DMEM	CP	TEC - 100	TEC - 50	TEC - 10	FBF - 100	FBF - 50	CN	CN	CN	DMEM	Vazio
A	0,331	0,094	0,213	0,349	0,711	0,134	0,178	0,668	1,741	2,126	0,089	
B	0,540	0,100	0,191	0,434	0,754	0,289	0,334	1,189	2,394	2,219	0,113	
C	0,093	0,098	0,182	0,310	0,293	0,146	0,197	1,504	2,194	2,038	0,103	
D	0,090	0,119	0,211	0,278	0,341	0,185	0,183	1,866	2,162	2,242	0,091	
E	0,084	0,094	0,158	0,198	0,478	0,109	0,276	1,540	2,312	1,596	0,109	
F	0,083	0,091	0,158	0,306	0,479	0,182	0,193	1,247	1,997	2,268	0,104	
G	0,771	0,096	0,151	0,231	0,398	0,139	0,294	1,896	2,429	2,152	0,085	
H	0,084	0,095	0,250	0,321	0,505	0,157	0,335	2,097	2,038	2,537	0,088	

Legenda: DMEM: meio de cultura; CP: controlo positivo; TEC – 100: Extracto da resina TEC na concentração 100%; TEC – 50: Extracto da resina TEC na concentração 50%; TEC – 10: Extracto da resina TEC na concentração 10%; FBF – 100: Extracto da resina FBF na concentração 100%; FBF – 50: Extracto da resina FBF na concentração 50%; CN: controlo negativo; Vazio: poço não utilizado neste ensaio.

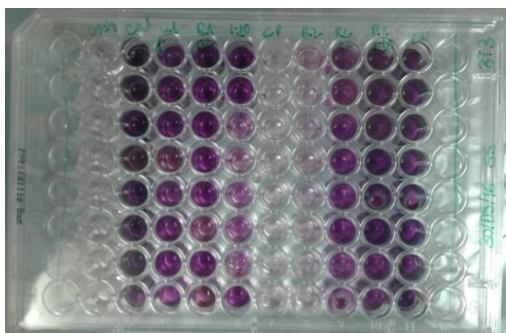


Figura nº 22 - Fotografia da placa de 96 poços após incubação das células por 24h com os extractos de resina e solubilização dos cristais de formazan com DMSO, imediatamente antes da análise espectrofotométrica.

Às 24h de contacto das células com os extractos de resina, a visualização ao microscópio óptico revelou que os poucos fibroblastos restantes sofreram evidentes modificações na sua morfologia original, fusiforme, tendo adquirido um fenótipo retraído e desarmonioso (Figura nº 23).

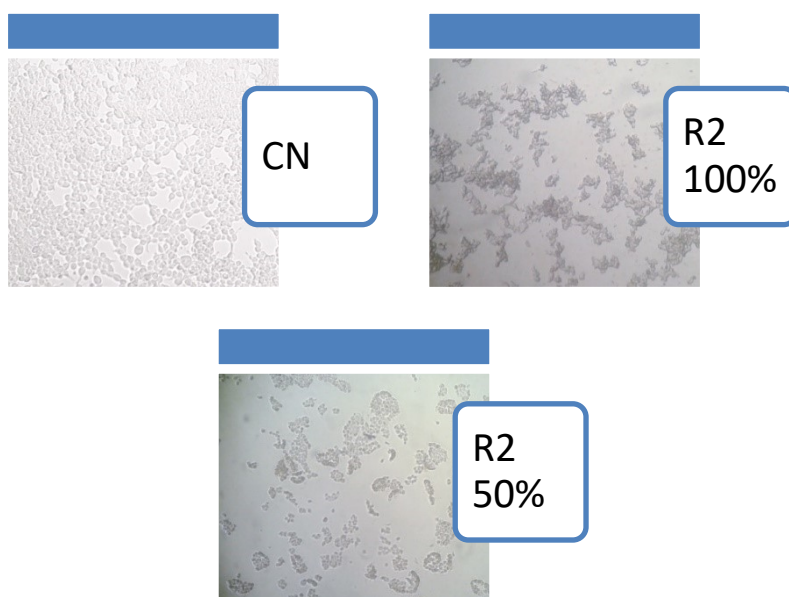


Figura nº 23 - Alterações morfológicas das células 3T3 observadas ao MO após 24h de contato com FBF nas concentrações de 100% e 50%, comparando com anatomia normal dos fibroblastos usados no controlo negativo (objectiva 10x).

2.2.Processamento estatístico dos resultados

Após comprovação do tipo de distribuição é normal em ambos os grupos testados (resinas) (Tabelas nº 12 e 13), através do teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), foi aplicado o teste paramétrico ANOVA *one-way* para validar as hipóteses experimentais propostas, utilizando os valores apresentados na Tabela nº 11.

Tabela nº 11 - Médias de absorvência de cada resina nas diferentes concentrações testadas

Concentração do extracto	Média absorvência TEC			Média absorvência FBF			Média absorvência CN		
	Média absorvência	Desvio-padrão	N	Média absorvência	Desvio-padrão	N	Média absorvência	N	Desvio-padrão
100%	0,011	0,034	8	0,011	0,055	8	1,812	24	0,367
50%	0,125	0,072	8	0,070	0,068	8			
10%	0,316	0,164	8	-	-	8			

- Resina TEC

Determinação do tipo de distribuição e correlação entre concentrações de extractos e valores de absorvência

Os valores de absorvência obtidos para TEC apresentam distribuição normal ($p > 0,05$), segundo o teste estatístico Shapiro-Wilk, representado na Tabela nº 12.

Tabela nº 12 - Teste de Normalidade – aplicado à resina TEC

	Concentração	Kolmogorov-Smirnov ^{a)}			Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Resultados	10%	0,225	8	0,200*	0,914	8	0,379
	50%	0,154	8	0,200*	0,967	8	0,876
	100%	0,194	8	0,200*	0,925	8	0,471

a) Correlação de Significância de Lilliefors

b) *. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

O Gráfico nº 1 que se segue reflecte visualmente os valores de absorvência em função de cada concentração testada na resina TEC, referentes à Tabela nº 11 acima.

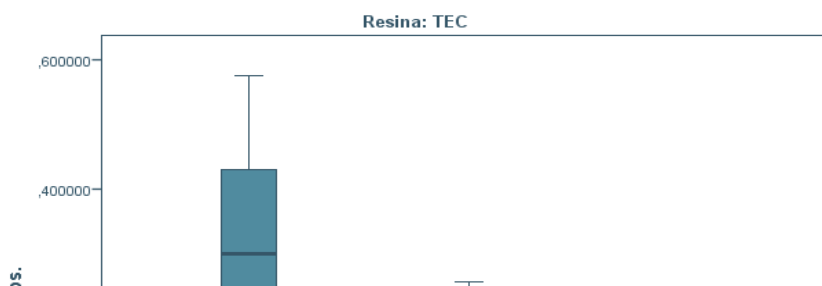


Gráfico nº 1 - Resina TEC: Valores de absorvência (eixo Y) em cada concentração (eixo X) (valores referentes à Tabela nº 11). Estão representados os valores máximos, mínimos, médias e distribuição das amostras entre cada variável.

- **Resina FBF**

Determinação do tipo de distribuição e correlação entre concentrações de extractos e valores de absorvência

A Tabela nº 13 indica que os valores de absorvência obtidos para FBF apresentam distribuição normal ($p > 0,05$).

Tabela nº 13 - Teste de Normalidade – aplicado à resina FBF

	Concentração	Kolmogorov-Smirnov ^{a)}			Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Resultados	50%	0,276	8	0,074*	0,834	8	0,065
	100%	0,251	8	0,146*	0,837	8	0,069

a) Correlação de Significância de Lilliefors

b) *. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

O Gráfico nº 2 reflecte visualmente os valores de absorvência em função de cada concentração testada na resina FBF, referentes à Tabela nº 11 acima.

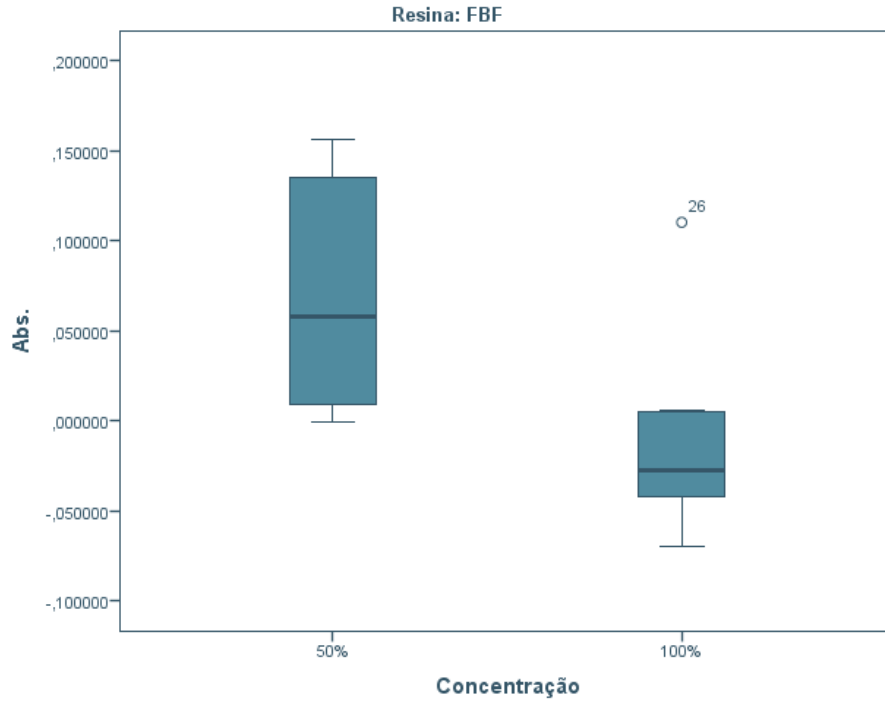


Gráfico nº 2 - Resina FBF: Variância dos valores de absorvência (eixo Y) em cada concentração (eixo X) testada (valores referentes à Tabela nº 11).

- **Controlo negativo**

Os valores de absorvência obtidos para o CN apresentam distribuição normal ($p > 0,05$).

Tabela nº 14 – Teste de normalidade – aplicado ao CN

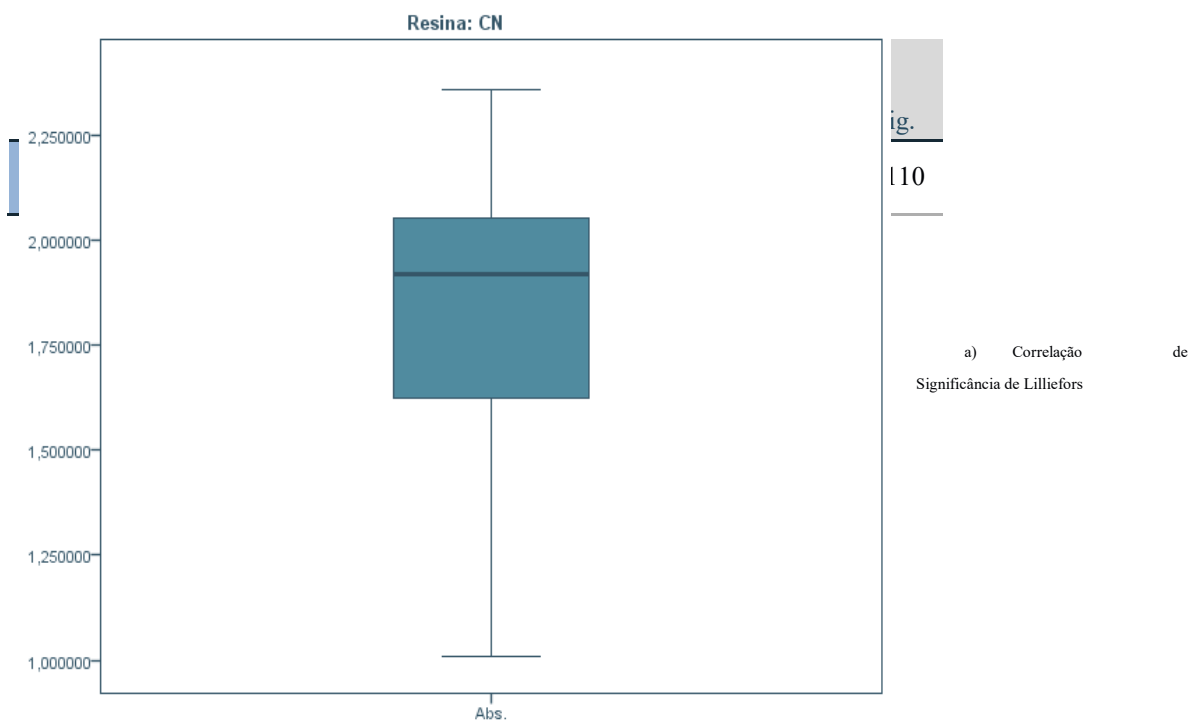


Gráfico nº 3 – Boxplot da absorvência do grupo CN.

Tal como indicado na Tabela nº 11 e nos Gráficos nº 1 e 2, verifica-se que todas as resinas causam diminuição da absorvância, logo da viabilidade celular. A viabilidade celular é afectada pela presença das resinas, visto ter havido em todas as situações diminuição de sobrevivência, quando comparado com o grupo controlo (CN), sem tóxico, ao qual se atribui um valor de 100% viabilidade. Assim, a viabilidade celular da cultura após a aplicação de cada concentração de resina encontra-se apresentada em percentagem na Tabela nº 15.

Tabela nº 15 - Comparação dos valores de viabilidade celular, em percentagem, entre as duas resinas testadas em cada concentração, contra o valor do controlo negativo.

Concentração do extracto	Viabilidade média resina TEC	Desvio-padrão	N	Viabilidade média resina TEC	Desvio-padrão	N	Viabilidade controlo negativo	N
100%	0,607	1,956	8	0,629	3,145	8		
50%	7,129	4,126	8	4,007	3,900	8	-	24
10%	18,071	9,372	8	-	-	-		
0% = CN	-	-	-	-	-	-	100,0	

Análise univariada da variância (ANOVA *one-way*)

Foi aplicado o teste estatístico ANOVA *one-way*, com um nível de significância de 5%, com o intuito de detectar relação entre as variáveis concentração do tóxico e viabilidade celular, descrito em seguida.

- **Correlação entre a concentração do tóxico e viabilidade celular**

Comprova-se que a variável “concentração” tem um efeito estatisticamente significativo sobre a viabilidade celular ($p < 0,05$) (Tabela nº 16). Isto é, o efeito citotóxico das resinas está relacionado com a quantidade de extracto adicionado, em ambas as resinas. Esta correlação é evidente nos Gráficos nº 1, 2 e 4.

Tabela nº 16 - Teste de efeitos entre sujeitos e respectiva significância estatística

Origem	Sig.
Resina	0,249
Concentração	0,000
Resina*concentração	0,609

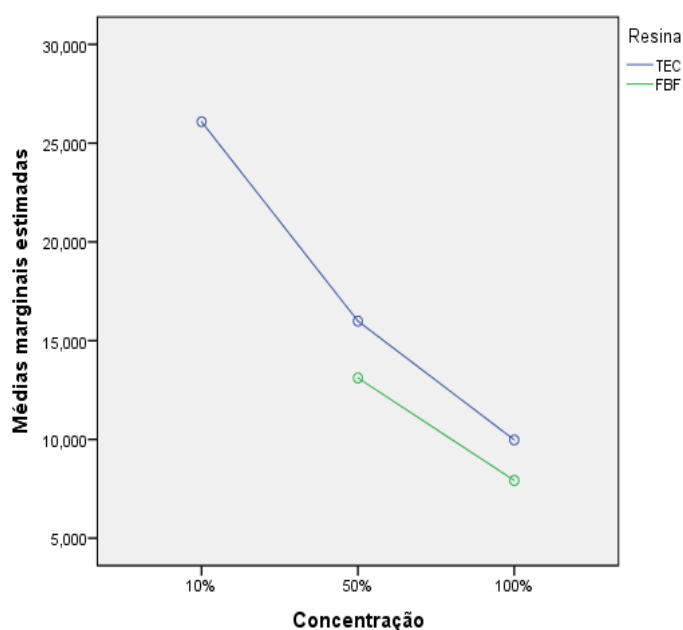


Gráfico nº 4 – Gráfico linear representativo da relação da concentração das resinas TEC e FBF (eixo X) na viabilidade celular (eixo Y), expressa em médias marginais.

Observando o Gráfico nº 4, que com o aumento da concentração da resina, a viabilidade celular diminuiu ($p < 0,05$). Além disso, há uma relação estatisticamente significativa entre a concentração do tóxico e a morte celular: quanto maior a concentração, maior a citotoxicidade da resina.

Deste modo, é aceite a hipótese alternativa b): A citotoxicidade das resinas aumenta com a concentração dos extractos.

- **Citotoxicidade comparativa entre resinas**

Para determinar se a hipótese nula a) “Não há diferenças significativas na toxicidade das resinas testadas” está correcta, também aplicámos o teste ANOVA *one-way*. Como mostra a Tabela nº 16, com o valor de $p > 0,05$ (Sig.= 0,249) na variável “efeito do tipo de resina”, não há diferença estatisticamente significativa entre os efeitos (citotóxicos) das 2 resinas.

Transformando os valores de viabilidade celular em citotoxicidade construímos a Tabela nº 17, que mostra que ocorreu morte celular acima de 80% na presença dos extractos de ambas as resinas em todas as concentrações. Por conseguinte, consideram-se ambos os produtos citotóxicos.

Tabela nº 17 - Citotoxicidade das resinas TEC e FBF para todas as diluições

Concentração do extracto	Citotoxicidade TEC	Citotoxicidade FBF
100%	99,4 %	100,6 %
50%	92,9 %	96,0 %
10%	82,0 %	-

Para comparar o efeito tóxico não diluído, aplicou-se mais uma vez o teste ANOVA *one-way*.

○ **Diluição 1:1**

Verifica-se que neste nível de concentração, a viabilidade celular é diminuída (> 70%) em ambas as resinas. No Gráfico nº 5, referente à diluição 1:1 (100% tóxico), observa-se uma diminuição da viabilidade celular da resina TEC para a FBF, resultado que nos remete para um maior efeito citotóxico da resina FBF, embora de forma não significativa ($p > 0,05$). A maior percentagem de morte celular encontrada neste estudo corresponde à FBF na diluição de 1:1.

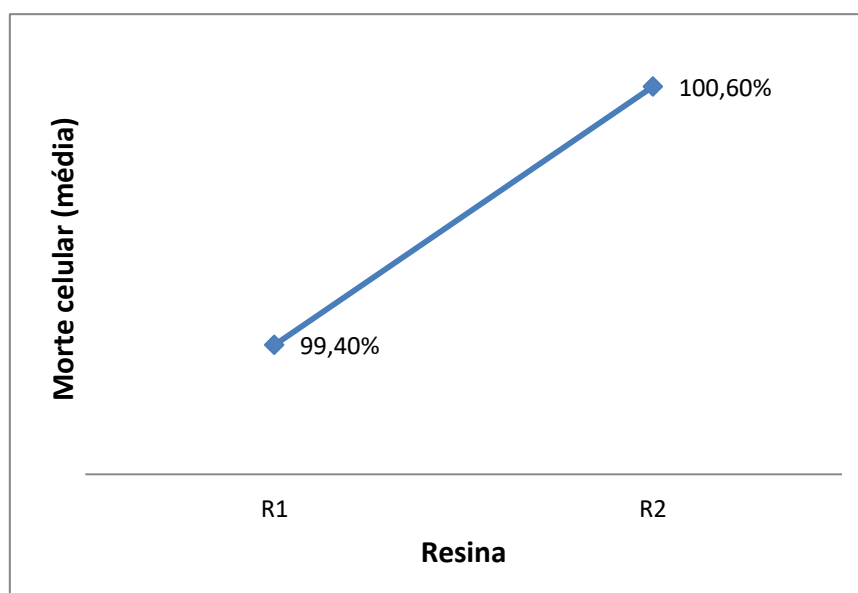


Gráfico nº 5 - Avaliação da toxicidade das resinas testadas para a diluição 1:1. Estes resultados correspondem aos valores de morte celulares descritos na Tabela nº 17.

○ **Diluição 1:2**

Aplicando o teste ANOVA *one-way* para comparar as resinas na diluição 1:2, verifica-se de igual modo que nesta concentração (50% concentração) a FBF tem maior percentagem de morte celular ($p > 0,05$) (Gráfico nº 6).

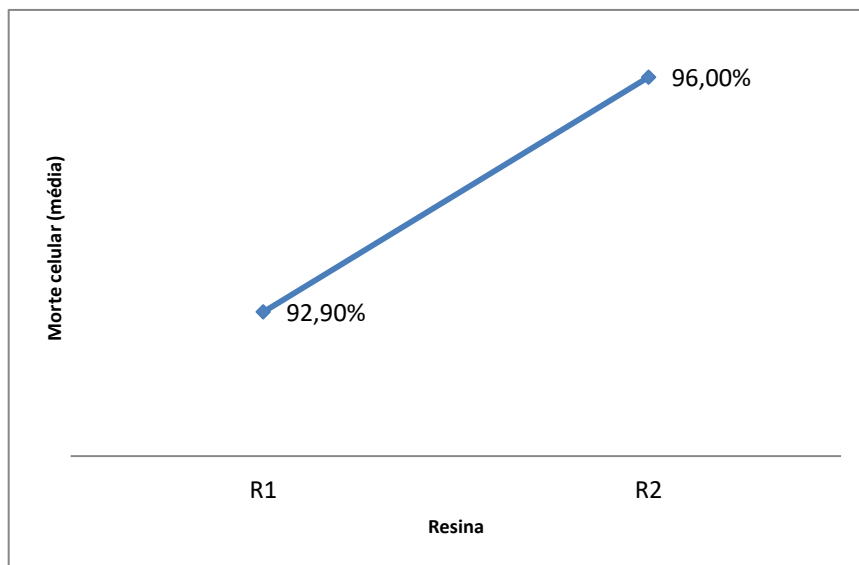


Gráfico n° 6 - Avaliação da toxicidade das resinas testadas para a diluição 1:1. Estes resultados correspondem aos valores de morte celulares descritos na Tabela n° 17

De acordo com os resultados deste estudo (Tabela n° 17; Gráficos n° 4 a 6), a resina FBF aparenta ser ligeiramente mais citotóxica do que a TEC, quando testadas nas mesmas condições de concentração e tempo de contacto. Ou seja, tanto nas diluições 1:1 como 1:2, é a FBF que demonstra provocar maior morte celular. No entanto, após análise verifica-se que esta diferença não é significativa em termos estatísticos ($p > 0,05$). Neste caso, a hipótese nula a) é aceite: Não há diferenças significativas na toxicidade das resinas testadas.

O Gráfico n° 7 mostra claramente que de uma forma geral a diferença de toxicidade entre as resinas é reduzida, nas mesmas condições de concentração do produto.

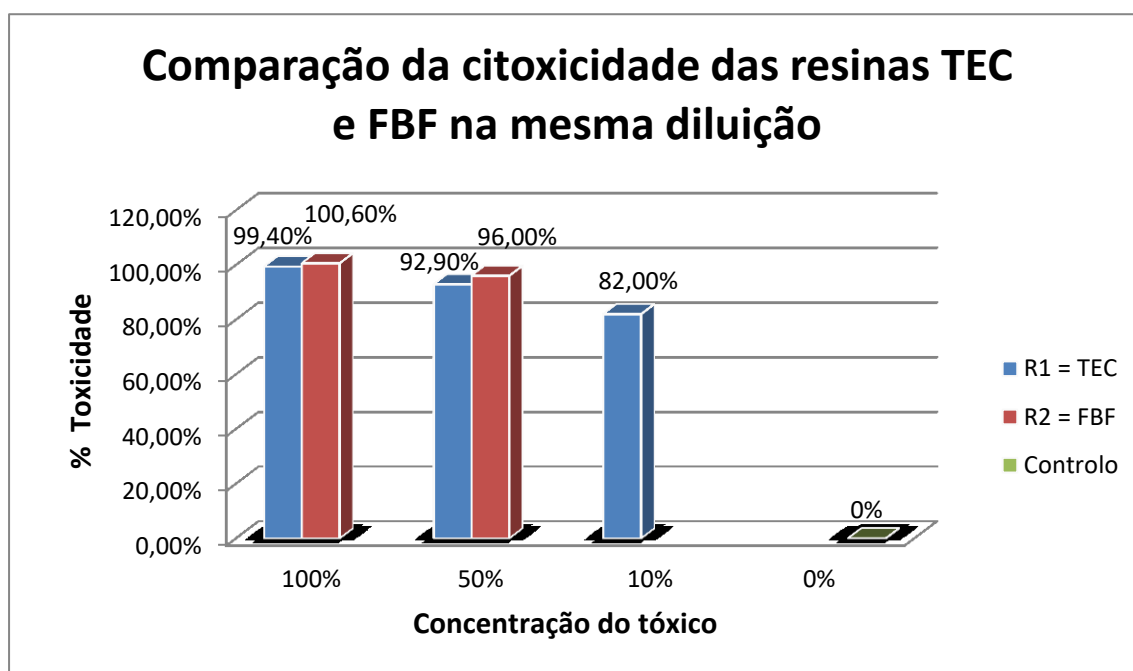


Gráfico nº 7 - Comparação gráfica da toxicidade das resinas nas mesmas concentrações

Em breve resumo: há um efeito estatisticamente significativo da concentração, mas não do tipo de resina na viabilidade dos fibroblastos após 24h de contacto.

IV. DISCUSSÃO

Com o surgimento dum qualquer novo material, é importante um olhar crítico sobre ele, daí a escolha deste tema para investigação. É aconselhada a análise das alterações na sua tecnologia que levam à publicidade do produto pela marca comercial, para além de avaliar como a *performance* clínica se compara com o seu homólogo convencional (Núñez, Camila et al, 2015). Além do mais, é exigido que os materiais dentários sejam biocompatíveis, ou seja, que não exerçam efeitos prejudiciais nos tecidos orais.

Tem-se observado “uma tendência crescente entre os médicos-dentistas no uso de resinas *Bulk Fill* devido à sua simplicidade de procedimentos” (Abed, Sabry, & Alrobeigy, 2015), permitindo incrementos até 4 mm de espessura. Porém, o tema das RBF tem estado associado a polémica, devido às dúvidas que levanta sobre a capacidade destes materiais serem adequadamente polimerizados em profundidade, o que, entre outras consequências, provocaria efeitos nocivos nas células da cavidade oral.

Uma polimerização adequada é essencial para o sucesso clínico, no sentido em que proporciona melhores propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Um grau de polimerização reduzido eleva a probabilidade de libertação de monómeros por polimerizar, associada a problemas de biocompatibilidade, descoloração, fraca adesão ao dente, e menor resistência pelas propriedades plastificantes desses monómeros.

É clinicamente relevante a preocupação sobre a biocompatibilidade das RC, tendo em conta a elevada quantidade de monómeros reconhecidamente tóxicos que as constituem e que comprovadamente são capazes de atravessar a dentina em espessuras mais reduzidas, podendo danificar as células pulpares (Hanks, Craig, Diehl, & Pashley, 1988). O *wash-out* salivar pode remover muitos dos componentes eluídos que seriam potencialmente citotóxicos na mucosa oral, no entanto, a saliva não executa uma limpeza absoluta no sulco periodontal ou bolsas periodontais e, naturalmente, nenhuma limpeza ocorre junto à polpa, logo, os monómeros poderão permanecer mais tempo nesses locais e exercer uma maior acção deletéria, causando reacções adversas como inflamação gengival ou pulpíte. É relevante tendo em conta que o tempo de contacto é um dos factores que influenciam a resposta do organismo ao agente irritante (Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, 1990) e sabendo que a concentração de monómeros aumenta ao

longo do tempo (Cebe et al., 2015), embora a maior parte da eluição ocorra nas primeiras 24h (Catrau, 2015).

É certo que um material não sairia à partida para o mercado se fosse comprovadamente tóxico. Este estudo não visa pretensiosamente pôr em causa a biocompatibilidade do produto ou afirmar que ele não está adequado a ser usado nas condições indicadas pelo fabricante. De facto, todos os materiais têm salvaguardas de utilização, tais como aconselhamento de utilização de luvas pelo médico-dentista e contra-indicações em doentes com comprovada alergia aos metacrilatos, componente principal das resinas. Embora os fabricantes revelem a maioria dos constituintes e suas modificações, há que ter em conta que diversos componentes não são relatados pela marca comercial na MSDS invocando “Trademark secret” (segredo da marca), algo que pode influenciar o comportamento clínico do produto (Anusavice et al., 2013).

Por outro lado, a quantidade de estudos disponíveis na literatura relativamente a RBF é ainda limitada para tirar conclusões definitivas. Poucos estudos foram ainda publicados tanto sobre as propriedades físicas como sobre questões de biocompatibilidade. Ainda existem menos estudos em ambiente clínico, de maior realidade, apesar da relevância que os resultados desses ensaios poderiam ter na apreciação do produto. Ensaio clínicos aleatórios a longo-prazo poderiam avaliar as RBF com uma base científica mais segura quanto a eventuais vantagens ou dificuldades de aplicação destes novos materiais mediante a técnica monobloco. Esperemos que num futuro próximo estes resultados sejam publicados.

A própria empresa fornecedora do material executa, nalguns casos, os seus próprios estudos. A Ivoclar Vivadent[®] alega na documentação científica do produto que a resina Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill (Ivoclar Vivadent[®]) não é citotóxica (Ivoclar Vivadent, 2004). Verifica-se que esta conclusão deriva de apenas um tipo de teste, o ensaio XTT, aplicado sobre a linha celular L929. Ora, a presente investigação aborda a citotoxicidade através de um tipo de teste distinto, o ensaio MTT, sobre células 3T3 e conclui que o produto inibe a viabilidade celular acima de 99,4% quando não diluído, sendo considerado citotóxico.

Deste modo, os estudos já efectuados não testam todas as variáveis possíveis. Não sendo inválidos, mas incompletos nas conclusões tiradas ao classificar como biocompatível um material baseado apenas num estudo. De um estudo para outro, pode

diferir a duração da exposição, as condições de temperatura, de pH, forma de avaliação, etc. É difícil encontrar um estudo que contenha todas as variáveis simultaneamente.

Além de todos estes factores, neste estudo, pretendia-se não apenas determinar a biocompatibilidade dum novo material no mercado, mas comparar o nível de citotoxicidade de dois diferentes materiais, aplicados nas mesmas condições. Mesmo que sejam ambos biocompatíveis ou citotóxicos.

Citotoxicidade comparativa das resinas TEC e FBF

No presente estudo, observou-se diminuição da taxa de viabilidade celular para todas as diluições (1:1, 1:2 e 1:10) da resina TEC e nas diluições 1:1 e 1:2 na FBF.

A viabilidade celular dos fibroblastos expostos a extractos com 100% de concentração foi de 0,6% na TEC e 0,63% na FBF, contra 100% no controlo negativo e 0% no controlo positivo. Comparando a viabilidade das células expostas a extractos na concentração de 50%, a viabilidade aumentou ligeiramente para 7,1% na TEC e 4,0% na FBF. Isto é o mesmo que dizer que a toxicidade da resina TEC foi de 99,4% e 100,6%, para extractos nas concentrações de 50% e 100%, respectivamente; enquanto que a toxicidade da resina FBF foi de 92,9% para extractos nas concentrações de 50% e 96% nos extractos com concentrações de 100%.

Dentro das limitações deste estudo, verifica-se que ambas as resinas são severamente citotóxicas nas condições testadas, acima dos 80% de morte celular. Resultados elevados já eram esperados tendo em conta o aspecto morfológico retraído ao MO dos fibroblastos, após as 24h de contacto com os extractos, ainda 24h antes da revelação do ensaio. É sabido que o monómero UDMA, componente major das resinas TEC e FBF, tem a capacidade de induzir tanto a diminuição da viabilidade celular como a produção de mediadores inflamatórios, e ainda é capaz de alterar a morfologia de células da polpa dentária humana, que por vezes ocorrem muito antes da morte celular (Chang et al., 2014).

A análise estatística culminou na conclusão de que não há diferenças significativas na toxicidade das resinas testadas ($p > 0,05$). Daí que a hipótese nula a) tenha sido aceite.

Vários estudos indicam que a citotoxicidade das resinas compostas sobre culturas celulares é devida a monómeros por polimerizar. A polimerização geralmente não é completa, causando a difusão através da dentina desses monómeros para células pulares, o que causa uma resposta negativa, determinada tanto pela natureza e quantidade das substâncias libertadas, bem como o tamanho das suas moléculas (Geurtsen, 2000; Kong, Jiang, Zhou, & Fu, 2009).

No estudo de Cebe et al. (2015), verifica-se que a TEC mostrou níveis de citotoxicidade superiores às outras seis RBF (incluindo FBF) do monómero Bis-GMA, nos períodos de 1h, 24h e 30 dias. Esta molécula é tóxica, portanto a sua grande eluição da TEC poderá justificar a elevada citotoxicidade desta resina como se comprovou neste estudo,

O baixo valor de viabilidade das células expostas a extractos da resina FBF também não surpreende. Num estudo que compara várias resinas compostas do tipo *Bulk Fill* e convencionais, detectou-se que os valores de grau de conversão imediatamente pós-polimerização e após 24h de FBF foram menores quando comparados com os outros materiais (Ruwaida Z. Alshali, Silikas, & Satterthwaite, 2013). Isso significa maior disponibilidade de monómeros residuais potencialmente tóxicos, o que coincide com os resultados do estudo de Lempel et al. (2016) que demonstraram que a FBF tinha vinte vezes maior quantidade de UDMA eluído e duas vezes mais Bis-GMA do que as RBF SureFil[®] SDR[®] Flow, X-tra Base e Filtek Ultimate Flow. Isto corrobora a conclusão de que a quantidade de monómeros eluídos tem uma relação inversa com o DC (Cebe et al., 2015).

Estes resultados são, de certa forma, compreensíveis sabendo que a resina FBF não polimeriza eficazmente em resposta a um comprimento de onda baixo (luz violeta), visto que o pico de absorção máximo do seu fotoiniciador, as CQ, corresponde a um comprimento de onda mais alto. Já a resina TEC possui dois tipos de fotoiniciadores mais reactivos à luz do que as CQ que podem justificar a sua polimerização mais eficaz, apesar de este problema poder ser ultrapassado se o fotopolimerizador usado for de amplo espectro de luz. Estes dados, a par do facto de que a tensão de contracção de polimerização da TEC é mais baixa do que a da FBF (Fronza et al., 2015), podem convergir para a maior preferência do uso da TEC numa situação clínica por alguns médicos-dentistas.

Era de esperar que nenhuma das resinas testadas apresentasse défices de polimerização ou consequentes problemas de biocompatibilidade seguindo as instruções dos fabricantes. Estes alegam melhores propriedades e composições. A ausência do monómero TEGDMA em ambas as resinas testadas, elevadamente tóxico, fazia prever níveis de citotoxicidade baixos, o que não se verificou. Por ter peso molecular baixo e exibir grande mobilidade, seria eluído mais facilmente do que moléculas de elevado peso molecular, como Bis-GMA, contribuindo para o aumento da toxicidade da resina. Contudo, também foi relatado que a sua baixa viscosidade e elevada reactividade contribuem para o aumento do grau de conversão da resina, quando comparados com Bis-GMA e UDMA (Cebe et al., 2015), componentes principais de TEC e FBF. Portanto, a ausência de TEGDMA na constituição destas resinas pode ter levado à menor conversão e maior eluição de monómeros residuais e valores elevados de morte celular em ambos os materiais.

A hidrofobicidade dos componentes das resinas é factor a ter em conta nas características finais da rede polimérica, na absorção de água e solubilidade da resina, na eluição dos monómeros e na citotoxicidade encontrada neste estudo (Ruwaida Z. Alshali et al., 2015). FBF e TEC são polímeros à base de Bis-GMA ou UDMA, hidrofílicos devido à presença dos grupos polares hidroxilo e ligações ao grupo uretano, respectivamente. Estes grupos formam ligações de hidrogénio com a água. Isto pode facilitar a penetração de saliva e diminuir as ligações mecânicas destes materiais (Kerby, Knobloch, Sharples, & Peregrina, 2013). Contudo, as resinas à base de Bis-EMA e associação de UDMA-Bis-EMA como as aqui testadas parecem ser mais hidrofóbicas do que as puramente à base de Bis-GMA (Ruwaida Z Alshali, Salim, Satterthwaite, & Silikas, 2015), tendo sido esperado menores níveis de solubilidade em água e menores níveis de citotoxicidade do que os obtidos. Por outro lado, Bis-GMA apresenta lipossolubilidade elevada, o que foi relacionado com a sua facilidade de penetração nas camadas lipídicas das membranas celulares e elevada citotoxicidade (Y. Issa, Watts, Brunton, Waters, & Duxbury, 2004).

Ambas as resinas apresentam constituições semelhantes, daí é compreensível que as diferenças na citotoxicidade não sejam significativas. A variedade química da matriz orgânica das resinas influencia as características finais da cadeia, mas a percentagem relativa de cada monómero também é relevante, o que nem sempre é conhecido.

Os valores de citotoxicidade não dependem apenas do material testado. Existem múltiplos factores extrínsecos que podem ter influenciado a resposta citotóxica em termos relativos ou absolutos, desde a escolha das células, passando por erros inerentes ao operador até ao à limitação do método usado na avaliação do parâmetro em questão.

Cada função e mecanismo celular varia de célula para célula (Vital, 2008). Estudos demonstram que linhas celulares humanas são mais sensíveis a testes de citotoxicidade do que as animais, como a linha 3T3. E, dentro das células humanas, as pulpares são mais resistentes do que as do ligamento periodontal (Rodríguez-Lozano et al., 2013). Logo, talvez houvesse linhas celulares mais adequadas a este estudo, com resultados eventualmente diferentes.

Embora tenham sido conduzidos todos os esforços para polimerizar eficazmente as resinas na fase de preparação, através do uso dum fotopolimerizador de alta intensidade adequado à gama de absorção dos fotoiniciadores, factores externos de polimerização podem ter ocorrido, influenciando os resultados. A inibição de polimerização pelo oxigénio tentou evitar-se através do uso de matriz de acetato por cima e por baixo de cada poço da matriz metálica. Outro aspecto detectado posteriormente foi o facto de a luz iluminar toda a placa de vidro quando se pretendia polimerizar apenas um espécime de cada vez, logo, admite-se a possibilidade de ter sofrido mais tempo de polimerização do que o recomendado, apesar de isso não ter originado valores de citotoxicidade reduzidos.

O protocolo usado é baseado em investigações semelhantes, tendo sido realizados diversos ensaios de optimização das condições ideais para este estudo até se obter um protocolo fiável e válido, por exemplo relativamente a volumes e concentrações lógicas.

Erros inerentes ao operador têm possivelmente um grande peso nas conclusões deste estudo, visto que os métodos laboratoriais requerem uma curva de aprendizagem, admitindo-se que possa ter havido pequenas variações intra e inter-ensaios, quanto à precisão de volumes, tempos, temperaturas, contagens, etc. O valor de 100,6%, obtido estatisticamente para a citotoxicidade da FBF na diluição de 1:1, está dentro do intervalo de erro experimental do operador razoável (o desvio-padrão encontra-se nas Tabelas nº 11 e 15).

Citotoxicidade dependente da concentração de resina

Verifica-se uma relação estatisticamente significativa entre a concentração de tóxico adicionado às células e a sua morte ($p < 0,05$). Esta associação tinha já sido corroborada por vários autores (Grimsdottir & Hensten-Pettersen, 1993; Cebe et al., 2015). A explicação mais razoável para esta dependência é que há medida que a diluição aumenta, a quantidade de monómeros e aditivos potencialmente tóxicos diminui no ambiente circundante às células.

Assim, a hipótese nula b): “A citotoxicidade das resinas não aumenta com a concentração dos extractos” foi rejeitada.

Relevância clínica dos resultados

Testar a citotoxicidade *in vitro* é a primeira etapa para assegurar a biocompatibilidade de um dispositivo médico e é crucial fazê-lo. Os testes *in vitro* são importantes porque permitem o controlo eficaz de muitas variáveis. Não podemos todavia esquecer as suas limitações no que toca à extrapolação de resultados para a situação clínica. Se os estudos em animais podem não ser imediatamente extrapoláveis para a mucosa humana, também os estudos *in vitro* não o podem ser extrapolados directamente para reacções *in vivo*.

Nesta investigação, conclui-se que ambas as resinas reduzem grandemente as taxas de viabilidade celular. Posto isto, ainda assim não se pode afirmar que as resinas Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) e Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®) não estão aptas a ser utilizadas numa situação clínica. Devido às razões apresentadas anteriormente que justificam as limitações deste estudo e a cautela que se deve ter relativamente aos resultados, é imprudente afirmar que estas resinas são perigosas demais para uso clínico baseando-nos apenas num teste positivo de citotoxicidade *in vitro*. De facto, a documentação relativa à segurança do material (MSDS) revela que estes não representam perigo para a saúde humana desde que usados da forma indicada pelo fabricante. Este resultado positivo alerta sim para a possibilidade de alguns dos componentes das resinas apresentarem citotoxicidade nas primeiras horas de contacto. Isso poderá suscitar interesse em pesquisas posteriores no sentido de identificá-las.

As descobertas indicam que a concentração do produto pode ser um parâmetro importante na análise de toxicidade em estudos *in vivo*.

A elevada citotoxicidade demonstrada deve colocar dúvidas quanto à biocompatibilidade *in vivo* das resinas compostas *Bulk Fill* testadas, visto que a possibilidade de serem colocadas em espessuras maiores pode apelar à sua utilização em cavidades mais profundas, mais próximas da câmara pulpar. A juntar a isso, acumula a agravante de a dentina ser mais permeável quanto mais próximo da polpa dentária (Summitt, 2013) e os monómeros serem capazes de se difundir através dela para as células pulpares, especialmente quando a espessura é reduzida (Geurtsen, 2000; Hanks et al., 1988).

Atendendo somente à comparação entre resinas, também não é possível afirmar que um material é mais seguro para uso clínico do que outro, pois foi demonstrada não haver diferença estatisticamente significativa entre elas. Ou seja, numa aplicação clínica, não é expectável haver citotoxicidade diferencial entre estes dois materiais.

Mesmo que houvesse diferenças e se optasse por um produto em detrimento de outro, ao usá-lo numa consulta, algumas variáveis clínicas mais difíceis de controlar poderiam fazer variar o DC, logo a quantidade de monómeros residuais tóxicos. Por exemplo, a distância da luz de polimerização à restauração deve ser a mínima possível em relação à superfície da restauração, contudo torna-se difícil garantir isso em dentes mais posteriores.

Há ainda outro aspecto clínico em jogo. A contracção de polimerização de um material, por exemplo, pode causar por si só tensão mecânica num dente, hipersensibilidade ao doente, bem como inflamação pulpar. Compósitos RBF fluidos contraem mais do que os não fluidos (Toh et al., 2015). As tensões desenvolvidas na polimerização com um composto fluido (por exemplo, FBF) podem resultar em microfractura, conduzindo a sensibilidade pós-operatória, independentemente do seu nível citotóxico. Ou seja, mesmo que o composto fosse considerado não-citotóxico nesta investigação, não poderíamos assumir que seria sempre biocompatível quando utilizado. E estes resultados que apontam citotoxicidade não garantem que as resinas não se comportem de forma biocompatível. Os estudos de citotoxicidade não são suficientes para determinar a biocompatibilidade de um material, sendo necessário mais estudos em diversas áreas para uma abordagem holística destes produtos.

Tendo em conta que a apoptose dos fibroblastos do periodonto está relacionada com gengivite, recessão gengival e doença periodontal (Arce et al., 2007; Mitic et al., 2013),

podemos deduzir que as resinas compostas usadas neste trabalho podem ser causa ou contribuir para o aumento da inflamação ou recessão gengival associada a dentes restaurados com estes materiais.

Com os resultados obtidos, espera-se que pelo menos se consciencialize a comunidade profissional médico-dentária para a importância do tema “biocompatibilidade dos materiais dentários” e que isso possa mudar comportamentos de modo a minimizar eventuais efeitos deletérios. O nível citotóxico da RC deve ser um factor a ter em conta na selecção dum material restaurador. O melhor é mesmo prevenir. Como podemos reduzir a citotoxicidade então? Um manuseamento cuidadoso dos compósitos resinosos, especialmente quando não polimerizado, é crucial para minimizar efeitos adversos no contacto com a pele e mucosas, dado que “muitos monómeros de resina passam facilmente através das luvas de látex” (Anusavice et al., 2013).

Seguir as instruções do fabricante já é crucial para diminuir o risco. Tal inclui o uso de um campo operatório seco para que a técnica estipulada seja executada nas melhores condições; evitar construir cavidades com ângulos pontiagudos que induzam tensões; evitar o uso de produtos à base de eugenol ou que contenham outras substâncias fenólicas, porque inibem a polimerização dos materiais resinosos à base de metacrilatos. Os fabricantes alertam inclusivamente para a possibilidade de sensibilização e alergia individual a alguns componentes, pelo que estão contra-indicados nessas situações. Além disso, recomenda-se a protecção pulpar indirecta em cavidades muito próximas da polpa dentária com hidróxido de cálcio, de forma a evitar eventuais irritações pulpares (3M ESPE, 2015; Ivoclar Vivadent, 2016).

Optimizar as condições de polimerização, ou seja, garantir que os tempos de incidência de luz se cumprem escrupulosamente e à menor distância possível da restauração evita a remanescência de monómeros, bem como os problemas de citotoxicidade e de desempenho clínico subsequentes (Ergun, Egilmez, & Yilmaz, 2011). A ponta do fotopolimerizador deve ser perpendicular à restauração, e o tipo de luz e espectro de radiação adequados ao tipo de fotoiniciador presente (Leprince et al., 2013).

Sugiro como continuidade de investigação deste estudo a aplicação doutros métodos de avaliação de citotoxicidade sobre os mesmos materiais para confirmar resultados, como o cristal-violeta. Um material pode ser citotóxico segundo um modelo de avaliação e não ser tão citotóxico noutro. Por exemplo, estudos demonstram que o MTT é

considerado menos sensível do que o teste de incorporação de ^3H -timina (Jorge et al., 2004). Ou, para aumentar a bateria de testes usada sobre estes materiais, como recomenda a ISO, testes de toxicidade dérmica, irritação da membrana mucosa, reacção genotóxica ou alérgica; Análise dos extractos das resinas TEC e FBF por HPLC permitiriam a identificação mais exacta dos compostos tóxicos e respectiva quantidade e, futuramente, substituição na fórmula dum monómero específico por alternativas mais biocompatíveis. O futuro passa por desenvolver resinas com menor quantidade das substâncias comprovadamente percoláveis e com alto grau de conversão monómero-polímero (Geurtsen, 2000).

Na meta-análise conduzida por Van Landuyt et al. (2011) que examina 22 estudos, conclui-se que “enquanto a libertação de monómeros foi analisada em muitos estudos, a de aditivos, como iniciadores, inibidores e estabilizadores, raramente foi investigada”. Isto apesar do facto de que equivalentes ou ainda maiores quantidades de aditivos do que monómeros possam eluir, segundo os mesmos autores. Desta maneira, a análise dos aditivos quanto à citotoxicidade da FBF e TEC também é uma hipótese a ter em conta.

O estudo do tempo de contacto é importante, tendo em conta que estes materiais são fabricados com vista à permanência em boca por longas décadas. Neste estudo, foi apenas estudada a citotoxicidade imediata, geralmente mais intensa. Eventualmente com o tempo, o nível de toxicidade diminui e perde-se a relevância clínica do nível de toxicidade imediato encontrado. Boullaget S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC (2002) concluem que os materiais são menos citotóxicos após 8 semanas da colocação, demonstrando a importância de testar a citotoxicidade a diferentes tempos. De qualquer modo, a diminuição da citotoxicidade com o tempo não garante que o material fica isento de provocar problemas de biocompatibilidade a longo-prazo, pois o efeito cumulativo ao longo de vinte anos de permanência no corpo humano pode resultar em quantidades duma substância em termos totais maiores do que as observadas nas primeiras 24h. Pelo contrário, Cebe et al., (2015) diz que a quantidade de substâncias eluídas aumenta com o tempo. Futuras pesquisas devem ser dirigidas às avaliações clínicas a longo prazo, pois só o uso *in vivo* pode dar respostas concretas e fidedignas quanto à eficiência e biocompatibilidade do produto.

Outro tipo de células poderá ser mais relevante do que as usadas neste estudo, por exemplo fibroblastos gengivais, derivados da mucosa oral, da polpa dentária ou de

células embrionárias humanas em vez das de murganho. Ou desenvolver testes *in vitro* que melhor recriem as condições *in vivo*: no futuro, as interações entre os subprodutos de resina e a matriz extracelular poderiam ser melhor reproduzidas caso fossem desenvolvidas culturas 3D, ao invés de em unicamada (2D). Por outro lado, as reações complexas mimetizadoras da situação *in vivo* que se poderiam obter com isso também seriam mais difíceis de interpretar (Geurtsen, 2000).

Outras variáveis podem ser testadas como o tipo de solvente, a espessura e tempos de fotopolimerização recomendados pelo fabricante *versus* mais tempo de polimerização.

Por fim, seria interessante investigar se as substâncias eluídas entram na corrente sanguínea têm distribuição sistêmica e/ou acumulação em órgãos e tecidos.

V. CONCLUSÕES

Para reparar tecidos dentários perdidos por algum tipo de patologia ou acidente, recuperando o bem-estar físico, psicológico e emocional dos doentes, a Medicina Dentária tem acompanhado o desafio de desenvolver terapêuticas reabilitadoras cada vez mais inovadores e correspondentes às exigências mecânicas e estéticas requeridas. O avanço científico trouxe-nos as resinas compostas *Bulk Fill*, uma geração relativamente recente que visa dar resposta a essas necessidades.

Para ser ideal, um material restaurador deve, entre muitas outras características, ser biocompatível e a sua segurança de uso cimentada em ilimitados estudos concordantes entre si que o comprovem.

Este estudo analisou a citotoxicidade *in vitro* imediata de duas resinas compostas *Bulk Fill*: Filtek™ Bulk Fill Posterior Restorative (3M™ ESPE) e Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®) através do ensaio MTT.

Dentro das limitações deste estudo, os resultados demonstram que ambas as resinas são severamente citotóxicas em todas as diluições testadas, embora sem diferenças significativas entre elas ($p > 0,05$). Logo, não há razão para preferir uma em detrimento da outra, no que diz respeito ao campo da biocompatibilidade, baseando-nos apenas nos resultados desta investigação.

Conclui-se também que a quantidade de monómeros tóxicos é relevante para a viabilidade celular, de forma significativa ($p < 0,05$), numa relação inversa: quanto maior a concentração do tóxico, menor a viabilidade. Por outras palavras, o efeito citotóxico das resinas Filtek™ Bulk Fill (3M™ ESPE) e Tetric EvoCeram® Bulk Fill (Ivoclar Vivadent®) é proporcional à sua concentração. Isto significa, em termos práticos, que cavidades dentárias maiores que precisem de ser preenchidas com maior quantidade de resina, são expectáveis de causar mais sensibilização pulpar por maior libertação de monómero. Não obstante, esta afirmação é apenas uma dedução, visto ser somente baseada num estudo *in vitro*, requerendo investigações adicionais no sentido de compreender o seu comportamento biológico.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 3M ESPE. (2015). Filtek™ Bulk Fill - Scientific Documentation.
- Abed, Y. A., Sabry, H. A., & Alrobeigy, N. A. (2015). Degree of conversion and surface hardness of bulk-fill composite versus incremental-fill composite. *Tanta Dental Journal*, 12(2), 71–80. <http://doi.org/10.1016/j.tdj.2015.01.003>
- Akah, M. M., Daifalla, L. E., & Yousry, M. M. (2016). Bonding of Bulk Fill versus Contemporary Resin Composites: A Systematic Review and Meta-analysis. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(20). <http://doi.org/10.17485/ijst/2016/v9i20/90525>
- al-Fawaz, A., Gerzina, T. M., & Hume, W. R. (1993). Movement of resin cement components through acid-treated dentin during crown cementation in vitro. *Journal of Endodontics*, 19(5), 219–23. [http://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81294-X](http://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81294-X)
- Alrahlah, A., Silikas, N., & Watts, D. C. (2014). Post-cure depth of cure of bulk fill dental resin-composites. *Dental Materials*, 30(2), 149–154. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.011>
- Alshali, R. Z., Salim, N. A., Satterthwaite, J. D., & Silikas, N. (2015). Long-term sorption and solubility of bulk-fill and conventional resin-composites in water and artificial saliva. *Dental Materials*. GEN. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.10.001>
- Alshali, R. Z., Salim, N. A., Sung, R., Satterthwaite, J. D., & Silikas, N. (2015). Analysis of long-term monomer elution from bulk-fill and conventional resin-composites using high performance liquid chromatography. *Dental Materials*, 31(12), 1587–1598. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.10.006>
- Alshali, R. Z., Satterthwaite, J. D., Silikas, N., Salim, N. A., & Sung, R. (2015). Qualitative and quantitative characterization of monomers of uncured bulk-fill and conventional resin-composites using liquid chromatography/mass spectrometry, 31(6), 711–720. GEN. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.03.010>
- Alshali, R. Z., Silikas, N., & Satterthwaite, J. D. (2013). Degree of conversion of bulk-fill

- compared to conventional resin-composites at two time intervals. *Dental Materials*, 29(9), e213–e217. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.05.011>
- Anusavice, K. J., Phillips, R. W., Shen, C., & Rawls, H. R. (2013). Overview of Preventive and Restorative Materials - "Standards for Dental Materials" (chap. 1, pp. 9-10); "International Standards" (chap. 1, pp 10-11); "How Safe are Dental Materials?" (chap. 1, pp. 12-15); Biocompatibility - "Adverse Effects from Exposure to Dental Materials" (chap. 7, pp. 115-117, 125-126, 136); "Biocompatibility Tests" (chap.7, pp. 138-140); "Clinical Guidelines for Selecting Biocompatible Materials" (chap. 7, pp. 141-143) in Phillips' science of dental materials (12a ed). USA: Elsevier.
- Arce, R. M., Tamayo, O., & Cortés, A. (2007). Apoptosis of gingival fibroblasts in periodontitis. *Colombia Médica*, 38(3), 197–209.
- Benetti, A., Havndrup-Pedersen, C., Honoré, D., Pedersen, M., & Pallesen, U. (2014). Bulk-Fill Resin Composites: Polymerization Contraction, Depth of Cure, and Gap Formation. *Operative Dentistry*, 1–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25216940>
- Boullaget S, Shaw L, Gonzalez L, Wataha JC, K. I. (2002). Long term cytotoxicity of resin based dental restorative materials. *J Oral Rehabil.*, 29(1998), 7–13.
- Brescia, P., & Banks, P. (2009). Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. *BioTek Instruments, Inc.*
- Bucuta, S., & Ilie, N. (2014). Light transmittance and micro-mechanical properties of bulk fill vs. conventional resin based composites. *Clinical Oral Investigations*, 1–10. <http://doi.org/10.1007/s00784-013-1177-y>
- Catrau, M. (2015). Caracterização dos Monómeros de Diferentes Resinas por HPLC. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Caughman, W. F., Caughman, G. B., Shiflett, R. A., Rueggeberg, F., & Schuster, G. S. (1991). Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials*, 12(8), 737–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1799649>

- Cebe, M. A., Cebe, F., Cengiz, M. F., Cetin, A. Ri., Arpag, O. F., & Ozturk, B. (2015). Elution of monomer from different bulk fill dental composite resins. *Dental Materials*, 31(7), e141–e149. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.04.008>
- Chang, H.-H., Chang, M.-C., Wang, H.-H., Huang, G.-F., Lee, Y.-L., Wang, Y.-L., ... 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. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.006>
- Corral Núñez, Camila; Vildósola Grez, Patricio; Miranda, Cristian Bersezio; dos Campos, Edson Alves; Fernández Godoy, E. (2015). REVISIÓN DEL ESTADO ACTUAL DE RESINAS COMPUESTAS BULK-FILL. GEN. <http://doi.org/10.17533/udea.rfo.v27n1a9>
- da Silva, E. M., Almeida, G. S., Poskus, L. T., & Guimarães, J. G. A. (2008). Relationship between the degree of conversion, solubility and salivary sorption of a hybrid and a nanofilled resin composite. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 16(2), 161–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089210>
- Darmani, H., & Al-Hiyasat, A. S. (2006). The effects of BIS-GMA and TEG-DMA on female mouse fertility. *Dental Materials*, 22(4), 353–358. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.04.029>
- dos Santos, R. L., de Sampaio, G. A., de Carvalho, F. G., Pithon, M. M., Guênes, G. M., & Alves, P. M. (2014). Influence of degree of conversion on the biocompatibility of different composites in vivo. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 16(1), 15–20. <http://doi.org/10.3290/j.jad.a29704>
- El-Damanhoury, H., & Platt, J. (2014). Polymerization shrinkage stress kinetics and related properties of bulk-fill resin composites. *Operative Dentistry*, 39(4), 374–82. <http://doi.org/10.2341/13-017-L>
- Ergun, G., Egilmez, F., & Yilmaz, S. (2011). Effect of reduced exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power led. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 19(3), 286–292. <http://doi.org/10.1590/S1678-77572011000300019>

- Ferracane, J. L. (1994). Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation*, 21(4), 441–452. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1994.tb01158.x>
- Ferracane, J. L. (2011). Resin composite—State of the art. *Dental Materials*, 27(1), 29–38. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.020>
- Ferracane, J. L., & Greener, E. H. (1986). The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *Journal of Biomedical Materials Research*, 20(1), 121–31. <http://doi.org/10.1002/jbm.820200111>
- Flury, S., Hayoz, S., Peutzfeldt, A., Hüsler, J., & Lussi, A. (2012). Depth of cure of resin composites: Is the ISO 4049 method suitable for bulk fill materials? *Dental Materials*, 28(5), 521–528. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.02.002>
- Flury, S., Peutzfeldt, A., & Lussi, A. (2014). Influence of increment thickness on microhardness and dentin bond strength of bulk fill resin composites. *Dental Materials*, 30(10), 1104–1112. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2014.07.001>
- Fronza, B. M., Rueggeberg, F. A., Braga, R. R., Mogilevych, B., Soares, L. E. S., Martin, A. A., ... Giannini, M. (2015). Monomer conversion, microhardness, internal marginal adaptation, and shrinkage stress of bulk-fill resin composites. *Dental Materials*, 31(12), 1542–1551. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.10.001>
- Fujisawa, S., Kadoma, Y., & Komoda, Y. (1988). ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *Journal of Dental Research*, 67(11), 1438–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183163>
- Furness, A., Tadros, M. Y., Looney, S. W., & Rueggeberg, F. A. (2014). Effect of bulk/incremental fill on internal gap formation of bulk-fill composites. *Journal of Dentistry*, 42(4), 439–449.
- Galvão, M. R., Caldas, S. G. F. R., Bagnato, V. S., de Souza Rastelli, A. N., & de Andrade, M. F. (2013). Evaluation of degree of conversion and hardness of dental composites photo-activated with different light guide tips. *European Journal of Dentistry*, 7(1), 86–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23407620>

- Geurtsen, W. (1998). Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *European Journal of Oral Sciences*, 106(2 Pt 2), 687–695. <http://doi.org/10.1046/j.0909-8836.1998.eos10602ii04.x>
- Geurtsen, W. (2000). Biocompatibility of Resin-Modified Filling Materials. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(3), 333–355. <http://doi.org/10.1177/10454411000110030401>
- Göpferich, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 17(2), 103–114. [http://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85755-3](http://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85755-3)
- Grimsdottir, M. R., & Hensten-Pettersen, A. (1993). Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 101(4), 229–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8362202>
- Hanks, C. T., Craig, R. G., Diehl, M. L., & Pashley, D. H. (1988). Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *Journal of Oral Pathology*, 17(8), 396–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146625>
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, C. R. (1990). Cytotoxic effect of resin components on cultured mammalian fibroblast. *J.Dent.Res*, 70, 1450–1455.
- Hilton, T. J., & Ferracane, J. L. (1999). Cavity preparation factors and microleakage of Class II composite restorations filled at intraoral temperatures. *American Journal of Dentistry*, 12(3), 123–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10649934>
- Hume, W. R., & Gerzina, T. M. (1996). Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 7(2), 172–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875031>
- Ilie, N., Bucuta, S., & Draenert, M. (2013). Bulk-fill resin-based composites: an in vitro assessment of their mechanical performance. *Operative Dentistry*, 38(6), 618–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23570302>
- Ilie, N., & Hickel, R. (2011). Investigations on a methacrylate-based flowable composite

- based on the SDR™ technology. *Dental Materials*, 27(4), 348–355. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.11.014>
- International Organization for Standardization. (2008). Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry.
- International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices. Parte 5: Testes de citotoxicidade in vitro (ISO 10993-5: 2009).
- ISO 4049:2009 Dentistry — Polymer-based filling, restorative and luting materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization 2009. (n.d.).
- Issa, Y., Watts, D. C., Boyd, D., & Price, R. B. (2016). Effect of curing light emission spectrum on the nanohardness and elastic modulus of two bulk-fill resin composites. *Dental Materials*, 32(4), 535–550. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.12.017>
- Issa, Y., Watts, D. C., Brunton, P. A., Waters, C. M., & Duxbury, A. J. (2004). Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. *Dental Materials*, 20(1), 12–20. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00053-8](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00053-8)
- Ivoclar Vivadent. Tetric EvoCeram Bulk Fill, Scientific Documentation. Intructions for use. (Internet) (Consultado 2016 Set 07) Disponível em: <https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUK Ewj-IOjV8v3OAhXEOBQKHZy4AOAQFggdMAA&url=>. (2004).
- Jorge, J. H., Giampaoli, E. T., & Pavarina, A. C. (2004). Citotoxicidade dos Materiais Dentários . Revisão de Literatura. *Revista de Odontologia Da UNESP*, 33(2), 65–68.
- Kerby, R. E., Knobloch, L. A., Sharples, S., & Peregrina, A. (2013). Mechanical properties of urethane and bis-acryl interim resin materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(1), 21–8. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60334-0](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60334-0)
- Kong, N., Jiang, T., Zhou, Z., & Fu, J. (2009). Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dental Materials*, 25(11), 1371–1375. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.06.008>
- Kusgoz, A., Ülker, M., Yesilyurt, C., Yoldas, O. H., Ozil, M., & Tanriver, M. (2011). Silorane-based composite: depth of cure, surface hardness, degree of conversion, and

- cervical microleakage in Class II cavities. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry : Official Publication of the American Academy of Esthetic Dentistry ... [et Al.]*, 23(5), 324–35. <http://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2011.00411.x>
- Lee, D. H., Kim, N. R., Lim, B. S., Lee, Y. K., & Yang, H. C. (2009). Effects of TEGDMA and HEMA on the expression of COX-2 and iNOS in cultured murine macrophage cells. *Dental Materials*, 25(2), 240–246. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.05.014>
- Lempel, E., Czibulya, Z., Kovács, B., Szalma, J., Tóth, Á., Kunsági-Máté, S., ... Böddi, K. (2016). Degree of Conversion and BisGMA, TEGDMA, UDMA Elution from Flowable Bulk Fill Composites. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 732. <http://doi.org/10.3390/ijms17050732>
- Lempel, E., Czibulya, Z., Kunsági-Máté, S., Szalma, J., Sümegi, B., & Böddi, K. (2014). Quantification of Conversion Degree and Monomer Elution from Dental Composite Using HPLC and Micro-Raman Spectroscopy. *Chromatographia*, 77(17–18), 1137–1144. <http://doi.org/10.1007/s10337-014-2647-3>
- Leprince, J. G., Palin, W. M., Hadis, M. A., Devaux, J., & Leloup, G. (2013). Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dental Materials*, 29(2), 139–156. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.11.005>
- Li, X., Pongprueksa, P., Van Meerbeek, B., & De Munck, J. (2015). Curing profile of bulk-fill resin-based composites. *Journal of Dentistry*, 43(6), 664–672. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.01.002>
- Malhotra, N., Kundabala, M., & Shashirashmi, A. (2010). Strategies to overcome polymerization shrinkage--materials and techniques. A review. *Dental Update*, 37(2), 115–8, 120–2, 124–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20415012>
- Mitic, K., Popovska, M., Pandilova, M., Jovanovic, R., Spasovski, G., & Nikolov, V. (2013). The role of inflammation and apoptosis in cyclosporine A-induced gingival overgrowth. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences / Udruženje Basičnih Mediciniskih Znanosti = Association of Basic Medical Sciences*, 13(1), 14–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23448605>
- Moharamzadeh, K., Van Noort, R., Brook, I. M., & Scutt, A. M. (2007). Cytotoxicity of

- resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental Materials*, 23(1), 40–44. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.039>
- Obici, A. C., Sinhoreti, M. A. C., Frollini, E., Sobrinho, L. C., de Goes, M. F., & Henriques, G. E. P. (2006). Monomer conversion at different dental composite depths using six light-curing methods. *Polymer Testing*, 25(3), 282–288. <http://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2006.01.006>
- Par, M., Gamulin, O., Marovic, D., Klaric, E., & Tarle, Z. (2015). Raman Spectroscopic Assessment of Degree of Conversion of Bulk-Fill Resin Composites – Changes at 24 Hours Post Cure. <http://dx.doi.org/10.2341/14-091-L>.
- Paranjpe, a, Bordador, L. C. F., Wang, M.-Y., Hume, W. R., & Jewett, a. (2005). Resin monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. *Journal of Dental Research*, 84(2), 172–177. <http://doi.org/10.1177/154405910508400212>
- Park, J., Chang, J., Ferracane, J., Lee, I. B., Davidson, C. L., Gee, A. J. de, ... Hood, J. A. (2008). How should composite be layered to reduce shrinkage stress: incremental or bulk filling? *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 24(11), 1501–5. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.03.013>
- Peutzfeldt, A. (1997). Resin composites in dentistry: the monomer systems. *European Journal of Oral Sciences*, 105(2), 97–116. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00188.x>
- Pilo, R., Oelgiesser, D., & Cardash, H. S. (1999). A survey of output intensity and potential for depth of cure among light-curing units in clinical use. *Journal of Dentistry*, 27, 235–241.
- Pongprueksa, P., De Munck, J., Duca, R. C., Poels, K., Covaci, A., Hoet, P., ... Van Landuyt, K. L. (2015). Monomer elution in relation to degree of conversion for different types of composite. *Journal of Dentistry*, 43(12), 1448–1455. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.10.013>
- Price, R. B., Murphy, D. G., & Dérand, T. (2000). Light energy transmission through cured resin composite and human dentin. *Quintessence International (Berlin, Germany:*

- 1985), 31(9), 659–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11203991>
- Rasines Alcaraz, M. G., Veitz-Keenan, A., Sahrman, P., Schmidlin, P. R., Davis, D., & Ihezor-Ejiofor, Z. (2014). Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3), CD005620. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD005620.pub2>
- Regina, L., Archegas, P., Rached, R. N., & Ignacio, S. A. (2009). Identification and Quantification of Monomers Released from Dental Composites Using HPLC, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52(August), 855–862.
- Rodríguez-Lozano, F. J., Serrano-Belmonte, I., Pérez Calvo, J. C., Coronado-Parra, M. T., Bernabeu-Esclapez, A., & Moraleda, J. M. (2013). Effects of two low-shrinkage composites on dental stem cells (viability, cell damaged or apoptosis and mesenchymal markers expression). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(4), 979–988. <http://doi.org/10.1007/s10856-013-4849-x>
- Rueggeberg, F. A., & Craig, R. G. (1988). Correlation of Parameters used to Estimate Monomer Conversion in a Light-cured Composite. *Journal of Dental Research*, 67(6), 932–937. <http://doi.org/10.1177/00220345880670060801>
- Sakaguchi, R. L., Douglas, W. H., Peters, M. C. R. B., Davidson, C. L., deGee, A. J., Feilzer, A. J., ... Cohen, G. (1992). Curing light performance and polymerization of composite restorative materials. *Journal of Dentistry*, 20(3), 183–188. [http://doi.org/10.1016/0300-5712\(92\)90136-Z](http://doi.org/10.1016/0300-5712(92)90136-Z)
- Samuelsen, J. T., Dahl, J. E., Karlsson, S., Morisbak, E., & Becher, R. (2007). Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dental Materials*, 23(1), 34–39. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.037>
- Soh, M. S., Yap, A. U. J., & Siow, K. S. (2004). Comparative depths of cure among various curing light types and methods. *Operative Dentistry*, 29(1), 9–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753326>
- Summitt, J. B. (2006). Biologic Considerations - "Dentin" (Chap. 1, pp. 9-12); Nomenclature and Instrumentation - "Nomenclature and Classification of Caries

- Lesions and Cavity Preparations (Chap. 6, pp. 129) in *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (3rd ed.). Quintessence Publishing.
- Sunbul, H. Al, Silikas, N., & Watts, D. C. (2016). Surface and bulk properties of dental resin- composites after solvent storage. *Dental Materials*, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2016.05.007>
- Surefill SDR, Flow, product Bochure 2009-2010, Dentsply International. (n.d.). Retrieved July 12, 2016, from http://www.surefilSDRflow.com/sites/default/files/SureFilSDRflow_brochure.pdf
- Tadin, A., Marovic, D., Galic, N., Kovacic, I., & Zeljezic, D. (2014). Composite-induced toxicity in human gingival and pulp fibroblast cells. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(4), 304–11. <http://doi.org/10.3109/00016357.2013.824607>
- 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. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00056-2](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00056-2)
- Tiba, A., Zeller, G. G., Estrich, C. G., Hong, A., Standardization, I. O. for, Dukic, W., ... Dacic, I. (2013). A Laboratory Evaluation of Bulk-Fill Versus Traditional Multi-Increment-Fill Resin-Based Composites. *The Journal of the American Dental Association*, 144(10), 1182–1183. <http://doi.org/10.14219/jada.archive.2013.0040>
- Toh, W., Yap, A., & Lim, S. (2015). *In Vitro* Biocompatibility of Contemporary Bulk-fill Composites. *Operative Dentistry*, 40-6, 644-652. In. <http://doi.org/10.2341/15-059-L>
- Üşümez, S., Büyükyılmaz, T., Karaman, A. I., & Gündüz, B. (2005). Degree of conversion of two lingual retainer adhesives cured with different light sources. *European Journal of Orthodontics*. 27 (2005) 173–179. <http://doi.org/10.1093/ejo/cjh085>
- van Dijken, J. W. V., & Pallesen, U. (2016). Posterior bulk-filled resin composite restorations: A 5-year randomized controlled clinical study. *Journal of Dentistry*, 5–11. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.05.008>
- Van Landuyt, K. L., Nawrot, T., Geebelen, B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K.,

- ... Van Meerbeek, B. (2011). How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dental Materials*, 27(8), 723–747. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>
- Versluis, A., Douglas, W. H., Cross, M., & Sakaguchi, R. L. (1996). Does an incremental filling technique reduce polymerization shrinkage stresses? *Journal of Dental Research*, 75(3), 871–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675797>
- Visalli, G., Barbara Baluce, B., Sebastiano La Maestra, B., Rosanna Tindara Micale, B., Luciano Cingano, B., Silvio De Flora, B., & Angela Di Pietro, B. (2012). Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. *Archives of Toxicology*, (87), 179–187. <http://doi.org/10.1007/s00204-012-0915-2>
- Vitral, J. C. D. A. (2008). Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada*, 8(3), 359–365. <http://doi.org/10.4034/1519.0501.2008.0083.0018>
- Volk, J., Engelmann, J., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (2006). Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 22(6), 499–505. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.06.002>
- Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203–209. <http://doi.org/10.1067/mpr.2001.117056>
- Wataha, J., Lockwood, P. E., Bouillaguet, S., & Noda, M. (2003). In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dental Materials*, 19(1), 25–31. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(02\)00012-X](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(02)00012-X)