



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

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE TRÊS RESINAS
COMPOSTAS *BULK FILL* UTILIZADAS EM DENTISTERIA**

Trabalho submetido por
Joana Rita Oliveira Mata Lima Neves
Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2017



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

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**EFEITO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE TRÊS RESINAS
COMPOSTAS *BULK FILL* UTILIZADAS EM DENTISTERIA**

Trabalho submetido por

Joana Rita Oliveira Mata Lima Neves

Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Doutora Isabel Barahona

Setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à minha orientadora, Doutora Isabel Barahona, pela confiança que depositou em mim.

Agradeço à Doutora Ana Clara Ribeiro e à Mestre Susana Bandarra por estarem sempre disponíveis para me esclarecer.

Agradeço à Mariana por ter-me acompanhado nesta aventura e por testar os meus conhecimentos.

Por fim, um agradecimento especial à minha família e aos meus amigos, por todo o amor, confiança, preocupação e apoio ao longo deste projecto.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Introdução: Actualmente, as resinas compostas são amplamente utilizadas em medicina dentária, mais propriamente na área da dentisteria. Os fabricantes deste tipo de biomateriais estão sempre a tentar melhorá-los, de forma a responder a todas as necessidades e exigências do mercado. Com isto em vista, foram desenvolvidas as resinas compostas *Bulk Fill*, que permitem a sua aplicação em bloco, com camadas até 4mm de espessura.

Objectivo: Avaliar e comparar a citotoxicidade e a genotoxicidade de três resinas *Bulk Fill* - Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill (R1), Filtek[™] Bulk Fill (R2) e Coltene Fill-Up![™] (R3).

Métodos: Neste estudo foram realizados como testes de citotoxicidade o ensaio do MTT e o ensaio do Cristal Violeta, como teste de genotoxicidade foi aplicado o ensaio dos micronúcleos. Os ensaios foram realizados *in vitro*, em fibroblastos de ratinho (3T3). Primeiramente foram efectuados os ensaios de citotoxicidade de onde se aferiu qual a dose letal média (DL₅₀) de cada uma das resinas, de seguida o teste de genotoxicidade foi aplicado expondo as células ao valor da dose letal de cada resina.

Resultados: Nos ensaios de citotoxicidade constatou-se uma maior citotoxicidade induzida pela resina R3 (DL₅₀ com a concentração relativa do extracto de 20%), seguida pela R1 (DL₅₀ com a concentração relativa do extracto de 50%) sendo a resina R2 a que mostrou ser menos citotóxica (DL₅₀ com a concentração relativa do extracto 60%). Relativamente à genotoxicidade todas as resinas provocaram alterações no DNA celular.

Conclusão: A R3 foi a que provocou mais efeitos citotóxicos, provavelmente devido ao baixo grau de conversão de monómeros. Todas as resinas mostraram efeitos genotóxicos, não tendo sido possível identificar qual a resina que provoca mais alterações genéticas nos fibroblastos de ratinho.

Palavras-Chave: *Bulk Fill*; Ensaio dos Micronúcleos; Ensaio do MTT; Ensaio Cristal Violeta.

ABSTRACT

Introduction: Currently, composite resins are widely used in oral medicine, more specifically in dentistry. The manufacturers of this type of biomaterials are always trying to improve them, in order to respond to all the needs and requirements of the market. With this in mind, the composite resins Bulk Fill were developed, which allow their application in block, with layers up to 4mm thick.

Objective: Evaluate and compare the cytotoxicity and genotoxicity of three resins Bulk Fill - Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill (R1), Filtek[™] Bulk Fill (R2) and Coltene Fill-Up! [™] (R3).

Methods: In this study, the MTT assay and the Violet Crystal assay were performed as a cytotoxicity test. The micronucleus assay was used as a genotoxicity test. The assays were performed in vitro on mouse fibroblasts (3T3). First, the cytotoxicity assays were performed from which the lethal dose of each resin was measured, then the genotoxicity test was performed exposing the cells to the lethal dose value of each composite.

Results: In the cytotoxicity assays were found a higher cytotoxicity induced by resin R3 (LD₅₀ with the relative concentration of the extract of 20%), followed by R1 (LD₅₀ with the relative concentration of the extract of 50%) and the R2 resin was shown to be the less cytotoxic (LD₅₀ with the relative concentration of the extract of 60%). Regarding genotoxicity, all resins caused changes in cellular DNA.

Conclusion: Possibly, due to the low degree of conversion of the resin monomers, R3 was the one that caused more cytotoxic effects. All resins showed genotoxic effects, it was not possible to identify which resin causes the most genetic alterations in mouse fibroblasts.

Keywords: Bulk Fill; Micronucleus Assay; MTT Assay; Crystal Violet Assay.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO	11
1.	Dentisteria	11
2.	Resinas compostas	11
2.1.	<i>Bulk Fill</i>	14
2.2.	Monómeros	15
2.3.	Polimerização	17
3.	Biocompatibilidade e Biomateriais	18
4.	Toxicidade	20
4.1.	Citotoxicidade	22
4.1.1.	Ensaio do MTT	23
4.1.2.	Ensaio do Cristal Violeta	23
4.2.	Genotoxicidade	24
4.2.1.	Ensaio dos Micronúcleos	25
II.	OBJECTIVO	28
III.	HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	28
IV.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
1.	Materiais	29
1.1.	Resinas Compostas Bulk Fill	29
1.2.	Linha celular	30
1.3.	Reagentes	31
2.	Métodos	32
2.1.	Preparação das Culturas celulares	32
2.2.	Preparação das resinas	34
2.3.	Ensaio do MTT	35
2.4.	Ensaio do Cristal Violeta	37

2.5.	Ensaio do Micronúcleo	39
2.6.	Análise Estatística	40
V.	RESULTADOS.....	41
1.	Preparação das Resinas	41
2.	Citotoxicidade	41
2.1.	Optimização do Número de Células.....	41
2.2.	Ensaio do MTT	42
2.3.	Ensaio do Cristal Violeta.....	45
3.	Genotoxicidade	47
3.1.	Ensaio do MN	47
VI.	DISCUSSÃO	50
1.	Citotoxicidade	50
2.	Genotoxicidade	54
VII.	CONCLUSÃO	57
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	59
IX.	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Apresentação comercial da resina R1 - Tetric EvoCeram [®] Bulk Fill	29
Figura 2 - Apresentação comercial da resina R2 - Filtek [™] Bulk Fill	29
Figura 3 - Apresentação comercial da resina R3 - Coltene Fill-Up! [™]	29
Figura 4 - Células 3T3 Aderentes, microscópio óptico invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA) (Ampliação 400x)	30
Figura 5 - Imagem de Microscopia Óptica representativa das células 3T3 presentes numa placa de Neubauer	33
Figura 6 - Molde Metálico utilizado para a confecção dos cilindros das diferentes resinas	34
Figura 7 - Cilindros resultantes da polimerização das diferentes resinas	34
Figura 8 - Cristais de Formazan produzidos durante o ensaio do MTT.	36
Figura 9 - Resultado típico de um ensaio de CV	38
Figura 10 - Resultados da Viabilidade celular em função de diferentes concentrações relativas dos extractos eluídos no ensaio do MTT	44
Figura 11 - Resultados da Viabilidade celular em função de diferentes concentrações relativas dos extractos eluídos no ensaio do CV	46
Figura 12 - Células 3T3 Mononucleadas, microscópio óptico Optika B-350 (Itália) (Ampliação 1000x)	47
Figura 13 - Células 3T3 Binucleadas com MN, microscópio óptico Optika B-350 (Itália) (Ampliação 1000x)	48
Figura 14 - Células 3T3 Binucleadas com vários MN, microscópio óptico Optika B-350 (Itália) (Ampliação 1000x)	48
Figura 15 - Número de Células vs Tipo de Célula	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de Reagentes	31
Tabela 2 - Volumes utilizados nas diferentes diluições dos extractos eluídos das Resinas	35
Tabela 3 - Volumes utilizados para preparação das diluições dos extratos correspondentes à DL ₅₀ utilizadas no ensaio do MN.....	39
Tabela 4 - Valores de absorvância obtidos no ensaio de optimização do número de células para ensaios de citotoxicidade	42
Tabela 5 - Valores do controlo Negativo no Ensaio do MTT	43
Tabela 6 - Média dos valores de absorvância obtidosna presença dos eluados de R1- Ensaio do MTT.....	43
Tabela 7 - Média dos valores de absorvância obtidos na presença dos eluados de R2 - Ensaio do MTT.....	43
Tabela 8 - Média dos valores de absorvância obtidosna presença dos eluados de R3- Ensaio do MTT.....	43
Tabela 9 - Valores do Controlo Negativo no Ensaio do CV	45
Tabela 10 - Média dos valores de absorvância obtidos na presença dos eluados de R1- Ensaio do CV.....	45
Tabela 11 - Média dos valores de absorvância obtidosna presença dos eluados de R2 - Ensaio do CV.....	46
Tabela 12 - Média dos valores de absorvância obtidosna presença dos eluados de R3 - Ensaio do CV.....	46
Tabela 13 - Contagem Celular dos Controlos do Ensaio do MN	47
Tabela 14 - Contagem Celular de R1, R2 e R3 do Ensaio do MN	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3	Células NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)
ATCC	Colecção Americana de Tipos de Culturas, do inglês - <i>American Type Culture Collection</i>
Bis-EMA	Bisfenol Etil Metacrilato, do inglês - <i>Bisphenol A glycol dimethacrylate</i>
Bis-GMA	Bisfenol Metacrilato de Glicidila, do inglês - <i>Bisphenol A-diglycidyl dimethacrylate</i>
BPO	Peróxido de benzoílo, do inglês - <i>Benzoyl peroxide</i>
COX-2	Ciclooxigenase-2
CQ	Canforoquinona, do inglês - <i>Camphorquinone</i>
CV	Cristal Violeta
DEGDMA	Dimetacrilato de dietilenoglicol, do inglês - <i>Diethylene Glycol Dimethacrylate</i>
DL ₅₀	Dose letal média
DMAEMA	Metacrilato de dimetilaminoetilo, do inglês - <i>2-(dimethylamino)ethyl methacrylate</i>
DMEM	Meio de Eagle Modificado de Dulbecco, do inglês - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMPT	Dimetil-para-toloidina, do inglês - <i>Dimethyl Paratoluidine</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido, do inglês - <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês - <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPIC	Cloreto de ipeniliodonio, do inglês - <i>Diphenyleneiodonium chloride</i>
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol, do inglês - <i>Ethylene glycol dimethylacrylate</i>

FBS	Soro Fetal Bovino, do ingles - <i>Fetal Bovine Serum</i>
HEMA	Hidroxietil Metacrilato, do ingles - <i>2-hydroxyethyl methacrylate</i>
ISO	Organização internacional para Padronização, do inglês - <i>International Organization for Standardization</i>
LED	Diodo Emissor de Luz, do inglês - <i>Light Emitting Diode</i>
MN	Micronúcleos
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, do inglês - <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
Neopen	Dimetacrilato de neopentilglicol, do inglês - <i>Neopentylglycol dimethacrylate</i>
PBS	Tampão fosfato, do inglês - <i>Phosphate-buffered saline</i>
PNA	Solução de Piruvato de Sódio, do inglês - <i>Sodium pyruvate solution</i>
R1	Resina 1 - Tetric EvoCeram [®] Bulk Fill
R2	Resina 2 - Filtek [™] Bulk Fill
R3	Resina 3 - Coltene Fill-Up! [™]
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês - <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	Instituto Memorial Parque Roswell (meio de cultura), do inglês - <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
T25	Frasco de cultura celular de 25 cm ²
TEEGDMA	Dimetacrilato de tetraetilenoglicol, do inglês - <i>Tetraethyleneglycol dimethacrylate</i>
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato, do inglês - <i>Triethylene glycol dimethacrylate</i>
TPP	Trifenilfosfano, do inglês - <i>Triphenylphosphane</i>
TPSB	Trifenil-stibane, do inglês - <i>Triphenyl-stibane</i>

UDMA Uretano Dimetacrilato, do inglês - *Urethane dimethacrylate*

USP Farmacopeia dos Estados Unidos, do inglês - *United States Pharmacopeia*

I. INTRODUÇÃO

1. Dentisteria

A dentisteria restauradora consiste na restauração de dentes que apresentem lesões de cárie, alterações de forma e de cor. Os materiais dentários restauradores consistem em compostos sintéticos que podem ser usados para reparar ou substituir estruturas dentárias, que incluem primers, agentes de ligação, cimentos, amálgamas, resinas compostas/compósitos, ionómeros híbridos, metalo-cerâmicas, cerâmicas entre outros. Os materiais restauradores podem ainda ser classificados como materiais de restauração directa e matérias de restauração indirecta, dependendo se a confecção da peça restauradora é feita intra ou extra-oralmente, respectivamente (Anusavice, K., Shen C., Rawls H., 2012).

A amálgama foi o material de eleição para tratamentos restauradores de dentes posteriores durante mais de 150 anos. Contudo, actualmente a sua utilização encontra-se em declínio devido às implicações ambientais e possíveis consequências sistémicas que podem advir da manipulação e da aplicação da amálgama, que tem na sua constituição básica mercúrio. Mas também, devido aos seus materiais concorrentes como é o caso das resinas compostas, que são superiores esteticamente, permitindo a escolha da cor que mais se assemelha à cor do dente natural. Possuem uma resistência comparável à amálgama e podem aderir à estrutura do dente, reduzindo a necessidade de remoção desnecessária da estrutura dentária para obter uma melhor retenção da restauração. No entanto, a contracção que ocorre durante a polimerização das resinas compostas, pode provocar falhas na adaptação marginal, que conseqüentemente pode favorecer o aparecimento de cáries secundárias, pigmentações marginais, microfissuras de esmalte e sensibilidade pós-operatória (Lim et al., 2016).

2. Resinas compostas

A Introdução de materiais dentários à base de resina foi feita no início do século passado, sendo uma inovação na medicina dentária restauradora.

O desenvolvimento e o uso generalizado de novas gerações de materiais restauradores dentários à base de resina permitiram a aplicação de técnicas restauradoras mais conservadoras, estéticas e duradouras. A maior parte do esforço científico e de fabrico nos últimos anos tem-se focado na melhoria da fracção das partículas destes materiais, existindo uma grande variedade de novas formulações de micro e nano-escala, na tentativa de melhorar as propriedades mecânicas e estéticas destes materiais (Bakopoulou et al., 2009).

As resinas compostas trazem como vantagens a sua estética, mimetizando a aparência do dente, a sua estabilidade dentro do ambiente oral, a sua fácil manipulação clínica e ainda o facto de melhorarem a polimerização quando expostas a LED ou outras ondas de luz azul (Jandt & Sigusch, 2009).

A técnica de aplicação das resinas compostas consiste na compactação de incrementos de 2mm de resina na cavidade a restaurar seguido da exposição à luz azul de um fotopolimerizador, voltando-se a incrementar 2mm de resina ou menos e a fotopolimerizar, até a cavidade estar preenchida. A técnica de camadas para o compósito à base de resina fotopolimerizável foi desenvolvida para superar o problema de contracção de polimerização e garantir que a polimerização seja adequada.

Actualmente os compósitos ainda apresentam algumas destas desvantagens, tais como: a contracção de polimerização, problemas de infiltração de cárie na interface dentina-resina, coeficiente de expansão térmica elevado e uma resistência ao desgaste relativamente baixa em comparação à amálgama dentária. Para além de tudo isto, a libertação de monómeros não polimerizados, das resinas compostas, pode levar a efeitos citotóxicos nos tecidos gengivais circundantes (Jandt & Sigusch, 2009).

Ao longo das últimas décadas têm desenvolvido a área dos materiais dentários com o intuito de melhorar e desenvolver as resinas compostas, de forma a aumentar a sua resistência e a sua longevidade clínica, tendo sido melhorada a sua matriz, capacidade de preenchimento e a tecnologia iniciadora presente na sua polimerização. Estas evoluções levaram os compósitos a adquirir taxas de sucesso clínico comparáveis ou superiores às da amálgama (Zorzin et al., 2015).

Os principais componentes das resinas compostas são os agregadores inorgânicos, a matriz de resina orgânica e o seu agente de ligação, o silano. A matriz orgânica

representa cerca de 20-40% da constituição do compósito e é composta principalmente por compostos monoméricos incluindo monómeros base, co-monómeros e aditivos (Ersev, Schmalz, Bayirli, & Schweikl, 1999).

A maioria das matrizes de resina consiste numa mistura de vários monómeros de metacrilato, tais como o bisfenol metacrilato de glicidila (Bis-GMA) e o dimetacrilato de uretano (UDMA) em combinação com co-monómeros de menor viscosidade tais como dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), dimetacrilato de tetraetilenoglicol (TEEGDMA), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA), dimetacrilato de neopentilglicol (Neopen) ou dimetacrilato de dietilenoglicol (DEGDMA), iniciadores como cloreto de ipeniliodonio (DPIC), conforoquinona (CQ), peróxido de benzoílo (BPO), metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEMA), dimetil-para-toloidina (DMPT) e ainda contaminantes tais como trifetil-stibane (TPSB) e / ou trifetilfosfano (TPP) (Schweikl, Spagnuolo, & Schmalz, 2006; Shehata et al., 2013).

Bowen no início dos anos 60 introduziu o monómero Bis-GMA como o primeiro monómero adequado para ser incorporado nas resinas compostas, destinadas a serem usadas como material restaurador dentário directo. O Bis-GMA é um monómero altamente viscoso devido aos seus grupos hidroxilo que aumentam sua polaridade. Geralmente é diluído com um dimetacrilato de trietileno glicol monomérico linear de baixo peso molecular (TEGDMA). A diluição de Bis-GMA com TEGDMA reduz a sua viscosidade, melhora as suas propriedades de manipulação e o seu grau de conversão. No entanto, a diluição de Bis-GMA com TEGDMA mostrou estar associada ao aumento da contracção de polimerização e adsorção de água (Alshali, Salim, Sung, Satterthwaite, & Silikas, 2015).

O UDMA é um monómero base de baixa viscosidade que tem peso molecular próximo do Bis-GMA, no entanto, a ausência dos anéis de fenol no UDMA resulta numa estrutura mais flexível e com alta dureza em comparação com Bis-GMA (Alshali et al., 2015).

O Bis-EMA é um análogo do Bis-GMA com baixa viscosidade devido à ausência de grupos hidroxilo. O Bis-EMA está disponível em diferentes pesos molares, dependendo do comprimento da cadeia de óxido de etileno entre os grupos aromático e metacrilato funcional e o aumento do grau de etoxilação do Bis-EMA reduz ainda mais

a viscosidade e aumenta a conversão, mas também aumenta a absorção de água e diminui a resistência à flexão (Alshali et al., 2015).

Combinações e proporções variáveis de monómeros são usados nas várias resinas compostas comercialmente disponíveis actualmente, resultando em diferentes sistemas de copolímeros, o que influencia o grau de conversão dos monómeros e a estrutura de copolímeros dos diferentes compósitos. A síntese de novos monómeros dentários é principalmente impulsionada pelo objetivo de reduzir a contração de polimerização, aumentando a biocompatibilidade dos materiais e maximizando o potencial de polimerização (Alshali et al., 2015).

Grande parte do esforço científico e de produção nos últimos anos tem-se focado na melhoria da fracção das partículas dos seus compostos, proporcionando uma grande variedade de novas formulações em micro ou nanoescala na tentativa de assim se melhorar as suas propriedades mecânicas e estáticas. Por outro lado, têm sido feitos poucos progressos em relação à matriz resinosa destes materiais, que é constituída por monómeros de metacrilato, na maioria dos produtos comercialmente disponíveis (Krifka, Spagnuolo, Schmalz, & Schweikl, 2013).

2.1. Bulk Fill

Em resposta às desvantagens associadas à técnica incremental, tais como a possibilidade de contaminação entre camadas, a dificuldade de manipulação devido ao acesso limitado em cavidades mais pequenas e o maior despendio de tempo entre colocações e polimerizações entre camadas, surgiram recentemente as resinas compostas *Bulk Fill*. Estas promovem a transmissão de luz de forma a permitir a obtenção de uma profundidade de polimerização até 4mm, sendo assim possível fazer aplicações de uma só camada até 4mm de espessura (Cebe et al., 2015).

Até agora já foram efectuados estudos com resultados positivos relativos à utilização destas resinas e o seu comportamento a nível de qualidade de adaptação marginal, deflexão cuspidica, microinfiltração, adesão à dentina, grau de conversão e profundidade de polimerização (Cebe et al., 2015).

Entre as possíveis desvantagens relativas às *Bulk Fill*, está o facto de a polimerização do material não ser completa ou insuficiente, pelo que nestas resinas foi melhorado o sistema de iniciadores de polimerização de forma a combater esta possível lacuna. No entanto, sabe-se que mesmo com um sistema de iniciadores melhorado o grau de conversão dos monómeros destas resinas em polímeros, não é completo. O grau de conversão diminui proporcionalmente com o aumento da profundidade do material, a energia associada ao aparelho fotopolimerizador diminui durante a passagem através de compósitos de resina por causa do fenómeno de dispersão da luz, devido ao tamanho e ao índice de refração das partículas de preenchimento. Uma diminuição do grau de conversão reduz a dureza final do material, aumenta a libertação de monómeros e aumenta consequentemente a citotoxicidade do material (Chun, Har, Lim, & Lim, 2016; Marigo et al., 2015; Toh, Yap, & Lim, 2015).

Como vantagens, as *Bulk Fill*, para além exigirem menos tempo de aplicação, têm menor contracção de polimerização, menor deformação cuspídea e boas forças de adesão independentemente da técnica de enchimento ou da configuração da cavidade a restaurar (Ilie & Stark, 2014).

A avaliação feita num estudo de cinco anos mostrou resultados clínicos aceitáveis com a nova técnica de preenchimento em bloco das *Bulk Fill*, semelhantes aos das técnicas convencionais de colocação incremental (Dijken & Pallesen, 2016).

2.2. Monómeros

Os monómeros são partículas constituintes das resinas compostas que através de uma reacção em cadeia, iniciada pela luz fotopolimerizadora, forma polímeros, que dão a consistência final do material restaurador.

A libertação de substâncias integrantes das resinas compostas pode ocorrer em dois momentos: durante a adaptação da resina composta e mais tarde quando a resina é degradada. O primeiro momento está relacionado com o grau de conversão ou com o encadeamento dos oligómeros em polímeros (Hanks, Strawn, Wataha, 1990; Ratanasathien et al., 1995).

Os monómeros de resina dentária que são libertados da matriz de resina sobretudo por não terem sido polimerizados influenciam várias funções biológicas e a viabilidade celular no ambiente oral (Bakopoulou et al., 2009; Schweikl et al., 2006).

Entre os vários monómeros, o HEMA e o TEGDMA são os principais monómeros libertados em quantidades relativamente elevadas de materiais restauradores. Considera-se que esses monómeros aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao aumento do stress oxidativo e à perturbação da homeostase intracelular (Krifka et al., 2013). Consequentemente é provável que estes monómeros de resina tenham vários efeitos nas células, incluindo inflamação, inibição da proliferação ou diferenciação celular e apoptose (Gallorini, Cataldi, & di Giacomo, 2014). O HEMA, em fibroblastos gengivais humanos, provoca reacções inflamatórias, com aumento da expressão do fator- α e ciclooxigenase tumoral (COX) -2 e a libertação de prostaglandina E2. Do mesmo modo, TEGDMA demonstrou induzir a produção de mediadores inflamatórios como COX-2, prostaglandina E2 e prostaglandina F2a em células da polpa dentária humana. Além disso, a libertação de HEMA e TEGDMA é conhecida por causar dermatite de contato alérgica *in vivo* (Aalto-Korte K, Alanko K, Aalto-Korte, Alanko, Kuuliala, & Jolanki, 2007; Bando et al., 2014).

O TEGDMA que não polimerizou tem efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagénicos e alergénicos, exibindo toxicidade sistémica e local. Os monómeros de TEGDMA podem servir de substrato a microrganismos que colonizam o espaço marginal, promovendo desta forma a proliferação de microrganismos cariogénicos como *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus sobrinus* (Lagocka, Jakubowska, Chlubek, & Buczkowska-Radliska, 2015).

Estudos *in vitro* em que fibroblastos humanos foram expostos a HEMA, mostram que na presença de saliva a toxicidade deste monómero diminui, verificando-se uma diminuição de fibroblastos necróticos quando comparado com os resultados obtidos no mesmo ensaio experimental mas sem a presença de saliva (Gallorini et al., 2014).

Apesar do HEMA e do TEGDMA serem os monómeros mais libertados a partir de materiais à base de resina não são os mais tóxicos. Nos fibroblastos humanos a toxicidade dos monómeros por ordem decrescente é: o Bis-GMA, o UDMA, o TEGDMA e finalmente o HEMA (Durner, Walther, Zaspel, Hickel, & Reichl, 2010; Urcan et al., 2010).

A causa fundamental dos efeitos colaterais induzidos por monómeros de resina é o stress oxidativo, que é mediado pela formação de ROS. No entanto, as ROS podem regular a expressão de genes sensíveis a reações de redução-oxidação e ativar vias de sinalização para várias funções, incluindo proliferação e diferenciação celular (Kwon, Park, Zhu, & Yang, 2015).

O HEMA e o TEGMA têm sido indicados como causadores de efeitos inibitórios sobre a proliferação e diferenciação celular em polpa dentária humana e em dentina. Além disso, o HEMA induz a apoptose em macrófagos de ratos através de danos oxidativos no DNA por uma via mitocondrial intrínseca ou por aumento da produção de ROS (Krifka et al., 2013). Dado que os osteoclastos são as células mais importantes para a regulação da periodontite, uma doença inflamatória crónica das gengivas com destruição óssea grave, é particularmente importante determinar se esses monómeros podem ter efeitos inflamatórios ou inibitórios sobre osteoclastos (Gallorini et al., 2014; Inamitsu et al., 2017).

2.3. Polimerização

A polimerização de um material consiste numa reacção iniciada por luz, de conversão de monómeros em polímeros.

O grau final de conversão dos monómeros em polímeros depende principalmente de fatores intrínsecos, como a estrutura química e concentração dos monómeros, do fotoiniciador e de fatores extrínsecos, como condições e modos de polimerização. Os fabricantes explicam que a maior profundidade de polimerização dos compósitos de resina *Bulk-Fill* é devida ao sistema iniciador mais potente e maior translucidez do material (Rothmund et al., 2017).

Se um compósito de resina ativado por luz não receber energia suficiente aos comprimentos de onda correctos a polimerização fica incompleta e isso pode resultar em desgaste e maior desagregação da restauração nas margens, redução da força de união entre o dente e restauração, dureza reduzida e maior citotoxicidade. Hoje em dia, já existem várias versões reforçadas de aparelhos de polimerização tal como o emissor

de luz de díodo, de arco de plasma, entre outros que emitem maior intensidade de luz que os convencionais (Ergun, Egilmez, & Cekic-Nagas, 2011).

A intensidade de luz efectiva disponível para a fotoactivação de monómeros de resina é influenciada pela distância entre a ponta do fotopolimerizador e o compósito de resina. Idealmente, a ponta do fotopolimerizador deve estar em contacto directo com a superfície da restauração. No entanto, às vezes a configuração da cavidade não permite uma polimerização eficiente a esta distância. Como consequência, a distância entre a ponta da luz e a restauração torna-se num parâmetro que ao influenciar a polimerização influencia também a citotoxicidade (Ergun et al., 2011).

No conjunto de componentes extraíveis dos materiais restauradores feitos à base de resina, incluem-se também as substâncias do seu sistema de polimerização, tais como fotossensibilizadores e iniciadores. O fotossensibilizador mais comumente utilizado é a canforoquinona. Esta substância já se provou ser libertada das resinas compostas, no entanto existem poucos estudos relativos aos seus potenciais efeitos adversos (Atsumi, Ishihara, Kadoma, Tonosaki, & Fujisawa, 2004). Contudo, nos estudos já efectuados demonstrou-se que a canforoquinona e outros agentes iniciadores são citotóxicos para fibroblastos gengivais humanos, induzindo interrupções no ciclo celular, alterações no DNA e morte celular na forma de necrose, mostrando a sua citotoxicidade e genotoxicidade (Bakopoulou, Papadopoulos, & Garefis, 2009).

3. Biocompatibilidade e Biomateriais

Um biomaterial é um material que foi feito para ser implantado no organismo de forma a reparar ou substituir um tecido em caso de doença ou de lesão. Estes materiais têm de ser biocompatíveis, isto é, biologicamente integráveis com as células dos tecidos onde vão ser colocados, de modo a não serem rejeitados pelo seu receptor e não induzirem reacções de toxicidade (Bakopoulou, Papadopoulos, & Garefis, 2009; Wataha et al., 1999).

De forma a averiguar a biocompatibilidade de um material é necessário efectuar vários testes biológicos. Estes testes têm como objectivo evitar a ocorrência de efeitos adversos *in vivo*. Os efeitos podem ser locais, sistémicos ou ambos. Diferentes efeitos

secundários resultantes da exposição a um material incluem reacções tóxicas, alérgicas, cancerígenas e teratogénicas (Mjör, 1990).

Em medicina dentária, todos os materiais utilizados interagem com os tecidos orais, provocando alterações tanto nos tecidos adjacentes como no próprio material em si, pois não existem materiais inertes, as interacções mútuas entre os tecidos e o material conduzem a uma resposta biológica equilibrada, sendo esta resposta a confirmação da biocompatibilidade do material (Hanks, Strawn & Wataha, 1990).

Existe uma conjugação de vários factores que pode alterar a biocompatibilidade de um material, tais como a resposta do hospedeiro, o ambiente e também as condições a que o material é sujeito (Vítal, 2008). A composição e estrutura química do material a utilizar afectam a quantidade e o tipo de substâncias químicas, eventualmente tóxicas, que são libertadas do material ao longo do tempo. Contudo, a abundância relativa das substâncias eventualmente tóxicas presentes no material não permitem prever a quantidade nem as proporções dos químicos libertados (O'Brien, 2008).

Para a utilização de novos materiais como biomateriais estes têm de ser submetidos à aprovação das entidades governamentais, que documentarão possíveis reacções adversas ao material. Esta informação inclui a história do material, a sua composição química e os resultados dos testes de biocompatibilidade aos quais o material foi sujeito, variando estes testes conforme a aplicação do produto e o prazo de permanência do produto no corpo (O'Brien, 2008).

A *Internacional Organization for Standardization* (ISO) implementou normas para definir os métodos dos testes de Biocompatibilidade: ISO 10993 e ISO 7405. O objectivo principal do padrão ISO 10993 é a protecção de seres humanos de potenciais riscos biológicos associados à utilização de dispositivos médicos (ISO 10993-1, 2009), incluindo os materiais dentários. A norma ISO 7405 complementa a anterior e especifica métodos de ensaio para a avaliação dos efeitos biológicos dos dispositivos médicos utilizados em Medicina Dentária (ISO 7405, 2008).

A *Internacional Organization for Standardization* (ISO) e o *Council on Dental Materials, Instruments and Equipment* of the *American Dental Association* sugerem a aplicação de vários ensaios *in vivo* e *in vitro* para estudar a biocompatibilidade dos materiais dentários: citotoxicidade, hemocompatibilidade, teste de implantação, irritação/reatividade intracutânea, sensibilização, toxicidade sistémica, pirogenicidade e

USP classe VI. Este último, o teste USP, consiste em avaliar a biocompatibilidade de dispositivos médicos, realizando testes *in vivo* de três tipos: aplicação de injeção intra-sistêmica, intra-cutânea e implantação do material a testar (Pacific BioLabs, 2009).

No desenvolvimento de qualquer biomaterial restaurador, a biocompatibilidade deve ser considerada além da durabilidade, da estética e da sua facilidade de manipulação clínica (Ratanasathien et al., 1995).

Não existe um método definido como o ideal para testar a toxicidade dos materiais restauradores e avaliar os seus efeitos biológicos, devendo ser aplicados vários testes para estabelecer o perfil da toxicidade dos materiais antes da sua introdução no mercado. Apesar de inicialmente os materiais serem avaliados *in vitro* com ensaios de citotoxicidade, note-se que estes resultados podem não ser iguais *in vivo* e refletirem diferentes resultados de toxicidade na prática clínica (Mjör, 1990).

4. Toxicidade

A toxicidade dos materiais dentários é um dado importante para compreender e prever o seu potencial efeito adverso à saúde (Geurtsen, 2003; Samuelsen, Dahl, Karlsson, Morisbak, & Becher, 2007; Schmalz, 2002).

De modo a determinar a toxicidade molecular das substâncias libertadas pelas resinas compostas têm-se desenvolvido várias técnicas para a avaliação do risco, avaliação da exposição, identificação do perigo e análises dose-resposta. Vários estudos mostram que os efeitos citotóxicos e genotóxicos podendo conduzir a perturbações significativas e irreversíveis das funções celulares básicas (Bakopoulou et al., 2009; Bakopoulou, Trivaii, Tsiftoglou, & Garefis, 2006).

Do ponto de vista biológico, existem preocupações acerca da biocompatibilidade e estabilidade bioquímica de monómeros e aditivos de resina para doentes e dentistas. Além disso, tem havido uma pesquisa intensiva sobre o potencial de iniciação de tumores e efeitos duradouros por xenobióticos perigosos em materiais dentários. Os monómeros, co-monómeros e aditivos não polimerizados são xenobióticos que podem ser libertados a partir de materiais à base de resina dentária durante a inserção e mesmo após a polimerização por meio de processos físicos e químicos directamente na

cavidade oral, ou através de microcanais dentinários na polpa onde podem atingir concentrações milimolares. Na polpa, podem danificar as células residentes e/ou atingir a corrente sanguínea. Após a absorção celular de monómeros ou co-monómeros, estes podem formar radicais intermediários, que podem ser metabolizados em compostos epóxi. Os intermediários epóxi têm potencial para atacar biomoléculas (através da formação de radicais), dentre as quais o DNA é o alvo mais crítico (Schweikl, Schmalz, & Spruss, 2001). Os monómeros podem induzir efeitos mutagénicos e cancerígenos em células orais e não só. Além disso, têm o potencial de aumentar os níveis ROS (Krifka et al., 2013). As ROS são mediadores reactivos da cascata de sinalização e níveis elevados de ROS podem interromper o equilíbrio redox celular, resultando em danos oxidativos do DNA e em apoptose celular. As ROS podem induzir efeitos tóxicos adversos nas células afetadas ou no organismo e podem induzir mutações no DNA designadas à genotoxicidade, incluindo teratogenicidade. Além disso, os componentes não polimerizados das resinas compostas podem induzir reações citotóxicas em fibroblastos gengivais humanos, reduzindo a viabilidade celular, devido a lesões na membrana plasmática, fragmentação de DNA e aumento da morte celular (Krifka et al., 2013; Schweikl et al., 2006; Shehata et al., 2013).

Sabe-se que o grau de difusão dos monómeros de resina através da dentina é modificado por parâmetros como a espessura da dentina remanescente, a permeabilidade da dentina ou a localização da dentina em contacto com o material resinoso influenciando conseqüente as suas manifestações tóxicas (Hume e Gerzina, 1996; Mjör e Ferrari, 2002).

Os monómeros de resina que influenciam as vias de transdução de sinal que respondem ao desequilíbrio do estado redox celular podem também ser capazes de alterar os efeitos das moléculas reguladoras como factores de crescimento e assim, influenciar uma variedade de funções na homeostase do complexo polpa-dentina (Goldberg e Smith, 2004). Os mecanismos celulares como por exemplo, a atividade secretora de odontoblastos ou de células semelhantes a odontoblastos, também pode ser afetadas. Embora a relação entre a gravidade da lesão celular tolerada pelos odontoblastos e a sua sobrevivência não seja clara, as concentrações de monómeros na polpa podem ser suficientemente elevadas para modificar, indirectamente, as respostas de reparação apropriadas como a regulação da dentinogénese reaccionária (Goldberg e Smith, 2004; Qin et al., 2004).

Já foram descritos vários episódios de dermatite de contacto alérgica provocada por monómeros de resina em trabalhadores na área da medicina dentária e também em doentes de medicina dentária expostos a materiais resinosos (Bando et al., 2014).

Alguns estudos aplicados às resinas *Bulk Fill* já demonstraram que graças à sua polimerização incompleta e consequente libertação de monómeros pode provocar algumas reacções alérgicas, incluindo dermatite de contacto, gengivite e ulcerações locais (Alshali et al., 2015).

Os esforços combinados que estão a ser feitos no campo da toxicologia celular sobre monómeros de resina melhorarão a compreensão de possíveis distúrbios sistémicos, bem como a identificação de potenciais efeitos adversos locais crónicos causados por materiais dentários (Schweikl, 2006).

4.1. Citotoxicidade

A citotoxicidade corresponde à potencialidade tóxica de uma substância a nível celular. Actualmente existem vários modelos de testes *in vitro* propostos pela *Internacional Standard Organization* (ISO) 10993 para avaliar a citotoxicidade de biomateriais. Estes incluem o modelo de teste de contato direto onde o biomaterial entra em contato com a camada celular; o teste de contacto indirecto onde existe uma barreira entre o biomaterial e a camada celular e o teste de extracto onde as células são expostas ao eluído do biomaterial. O objectivo de ter três modelos de teste diferentes é proporcionar uma avaliação mais rigorosa da citotoxicidade do biomaterial (Lim et al., 2016).

Os testes de citotoxicidade *in vitro*, têm a vantagem de se poder controlar os factores experimentais, o que não é possível em experiências *in vivo*. *In vitro* os métodos são reprodutíveis, há uma boa relação de custo-benefício e são adequados para a avaliação das propriedades biológicas básicas dos materiais dentários.

Materiais não biocompatíveis ou citotóxicos podem causar inflamação de tecidos a curto ou longo prazo ou morte celular. Até agora, tem havido numerosas publicações relativas à citotoxicidade *in vitro* de vários materiais dentários, alguns deles têm-se

centrado na avaliação da citotoxicidade dos monómeros e oligómeros puros e outros na citotoxicidade dos eluentes dos materiais (Rodrigues-lozano, 2013). Sabe-se que também que o nível de citotoxicidade de um material pode alterar-se ao longo do tempo (Mahasti, Sattari, Romoozi, & Akbar-Zadeh Baghban, 2011).

Todos os ensaios de citotoxicidade são projectados para a análise da proliferação e viabilidade celular. Estes ensaios exigem uma boa técnica e prática laboratorial, consistem numa sequência protocolada de acções. No entanto, quando falha um passo ou quando muda o operador podem induzir resultados díspares, além de que podem existir interferências na leitura das amostras uma vez que estas são baseadas em detecções ópticas para a maioria dos ensaios, tais como a absorvância, luminescência ou fluorescência, que são vulneráveis a distorções involuntárias (Urcan et al., 2010).

4.1.1. Ensaio do MTT

Um dos testes de citotoxicidade mais utilizados é o ensaio do MTT. O ensaio do brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), foi inicialmente descrito por Mosmann (1983), e consiste num método colorimétrico de determinação da viabilidade celular, avaliando a citotoxicidade de um determinado composto. O ensaio consiste na redução metabólica do MTT, um sal de cor amarela, que por ação das desidrogenases mitocondriais convertem este sal num produto de cor púrpura, o formazan. Este processo só decorre se as células estiverem viáveis, se as mitocôndrias estiverem funcionais, ou seja se a membrana interna das mitocôndrias estiver intacta permitindo a actividade das desidrogenases membranares. Quanto menor for a viabilidade celular menor será a redução do MTT e menor será o valor da sua absorvância no espectrofotometro, sendo então a concentração de formazan formado directamente proporcional à actividade mitocondrial e por conseguinte à viabilidade celular (Meerlo, Kaspers & Cloos, 2011; Castro-garza et al., 2017).

4.1.2. Ensaio do Cristal Violeta

O ensaio de coloração com cristal violeta (CV) é outro ensaio simples e reprodutível de citotoxicidade, muito semelhante ao MTT. Neste ensaio é utilizado o cristal violeta

como solução corante, esta solução corresponde a um corante de trifenilmetano também conhecido como violeta de genciana, que tal como o MTT permite a realização de um teste colorimétrico, através da coloração específica das células viáveis. Este agente vai corar o DNA das células pelo que em alguns casos, todas as células aderentes, incluindo células mortas, são consideradas como células viáveis devido à coloração não específica do cristal violeta, como também acontece em outros ensaios protéicos, sendo este ensaio por este motivo um ensaio complementar tendo sempre os resultados de outra experiência de viabilidade celular como referência (Almutary & Sanderson, 2016; Castro-garza et al., 2017; Chiba, Kawakami, & Tohyama, 1998).

A diferença entre o ensaio do cristal violeta e do ensaio do MTT é que através de um definimos a citotoxicidade através da morte celular e outro através da actividade metabólica, respectivamente (Almutary & Sanderson, 2016).

4.2. Genotoxicidade

A genotoxicidade ou toxicologia genética consiste num ramo da toxicologia em que se avaliam os efeitos de agentes químicos e físicos provocados no DNA e nos processos genéticos das células vivas. Existem quatro tipos de estudo dos efeitos nocivos onde se avalia e identifica o risco, sendo estes os seguintes: classificação pela relação estrutura actividade, onde é feita uma estimativa da toxicidade de um xenobiótico através de comparações com outros compostos quimicamente semelhantes ao composto em estudo; ensaios *in vitro* que avaliam a acção do xenobiótico em células ou organismos unicelulares; estudos *in vivo*, através da administração do xenobiótico em animais ou plantas sob condições controladas; e estudos epidemiológicos, através da observação de uma população exposta ao xenobiótico (Klaassen, 2007).

Geralmente, o principal objectivo é testar directamente a influência citotóxica do material, contudo, na área dos materiais dentários o foco da questão está especialmente dirigido para os efeitos que o material pode ter a longo prazo, sendo para isso mais adequados os testes de genotoxicidade e mutagenicidade (Müller, Eisenträger, Jahnendechent, Dott, & Hollender, 2003; Stea et al., 1998). Genotoxicidade e mutagenicidade têm diferentes definições, mutagenicidade refere-se à produção de alterações genéticas

transmissíveis, enquanto a genotoxicidade provoca mutações mas estas não são transmissíveis de célula para célula nem de geração em geração (Klaassen, 2007).

Os ensaios de genotoxicidade são utilizados para identificar os agentes mutagénicos e potenciais cancerígenos de células germinativas e somáticas. Estes ensaios conseguem detectar diversos tipos de alterações genéticas relevantes para a saúde humana, incluindo mutações genéticas, aberrações cromossómicas e aneuploidias. Os ensaios têm como finalidades identificar agentes mutagénicos de forma a avaliar o risco e caracterizar a relação dose-resposta e identificar os mecanismos mutagénicos associados (Klaassen, 2007). Os testes de toxicologia genética apresentam como vantagens: as suas técnicas de baixo custo, resultados rápidos, fornecem informações relativas aos mecanismos mutagénicos e permitem o planeamento de testes de longo prazo *in vivo* (Klaassen, 2007).

O risco de contacto com substâncias potencialmente mutagénicas ocorre sempre que o corpo está exposto a biomateriais implantados para substituir ou integrar uma parte anatómica do corpo. Este princípio básico indica a importância da determinação da segurança de um material implantado no corpo humano, do ponto de vista genotóxico, como é o caso dos materiais dentários (Stea et al., 1998).

Actualmente, através de alguns estudos já efectuados sabe-se que certos componentes presentes nas resinas compostas, tal como o TEGDMA, podem induzir alterações no DNA e a morte celular em células orais humanas (Shehata et al., 2013).

4.2.1. Ensaio dos Micronúcleos

O desenho do protocolo é crucial para a obtenção de resultados significativos na avaliação do potencial genotóxico da substância a testar. A escolha do sistema celular, a duração do tratamento, a utilização de um bloqueador de citocinese, a adição de componentes metabólicos, pode influenciar significativamente o resultado do teste. Usando células primárias ou linhas celulares, a duração do ciclo celular é essencial para definir a duração da cultura. A duração do tratamento deve abranger todas as fases do ciclo celular para permitir uma interacção correcta das substâncias em teste, com todos os componentes celulares potencialmente relevantes para a genotoxicidade (Kirsch-Volders et al., 2011).

O micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal da célula, formado por cromossomas ou fragmentos de cromossomas que não são incluídos no núcleo principal no final da mitose e que ficam no citoplasma. Estes micronúcleos são indicadores de que houve alterações nos cromossomas devido à presença de um agente estranho ao organismo, um xenobiótico, que provoca uma quebra na molécula de DNA (Fenech, 2000).

Embora os mecanismos de reparação celular sejam eficientes, nem sempre conseguem reverter os efeitos durante a mitose e meiose, dos agentes clastogénicos, que são agentes físicos ou químicos capazes de provocar quebras no ADN dos cromossomas, e dos agentes aneugénicos, agentes químicos que interferem na ligação entre os cromossomas e o fuso mitótico sendo assim capazes de provocar aneuploidias e poliploidias (Holland et al., 2008).

Os micronúcleos podem ser únicos ou múltiplos, e têm de preencher os seguintes critérios: 1. Estrutura da cromatina (histonas e ADN) e intensidade da cor similar ou mais fraca do que a do núcleo principal; 2. Membrana nuclear visível; 3. Formato arredondado; 4. Localização dentro do citoplasma; 5. Diâmetro 5 vezes menor do que o núcleo principal (Fenech, 2000).

A relevância toxicológica do teste do micronúcleo está bem definida: é um teste genotóxico com vários alvos, avalia não só eventos clastogénicos e aneugénicos como também alguns efeitos epigenéticos; é simples de avaliar, é preciso e aplicável em diferentes tipos de células. Além de ser preditivo de cancro, permite uma boa extrapolação para potenciais limites de exposição e determinação de limiares, além de poder ser aplicado em experiências *in vitro* e *in vivo* (Kirsch-Volders et al., 2011).

O teste do micronúcleo tem a vantagem de ser de baixo custo, rapidez de análise para triagem de grande número de substâncias, e de permitir considerar e avaliar as alterações cromossómicas nas diferentes fases da farmacocinética dos medicamentos. O procedimento técnico é fácil, simples, sendo através deste método fácil observar e contar as alterações cromossómicas, é uma técnica que não exige um técnico com uma alta especialização, como nos casos de outros ensaios de alterações cromossómicas (Flores & Yamaguchi, 2008).

O aumento da frequência de micronúcleos não traduz a possibilidade da célula desenvolver uma transformação maligna, na medida em que a técnica não permite

avaliar a importância dos fragmentos de DNA separados, nem verificar se o DNA no micronúcleo pode ou não ser transcrito. No entanto, se houver uma exposição constante a agentes genotóxicos a capacidade de reparação do organismo irá diminuir, o que levará à ocorrência de fenómenos degenerativos capazes de gerar a morte celular ou por outro lado levar a danos cumulativos originando transformações malignas (Carrard, Costa, Ferreira, & Lauxen, 2007).

De forma a melhorar a técnica do micronúcleos utilizada na avaliação de alterações no DNA em humanos, foi criado o Human MicroNucleos Project. Este projecto internacional tem como objectivos recolher todas as informações relativas aos micronúcleos, tais como frequências de MN em diferentes populações humanas e em diferentes tipos de células. Estas informações serão úteis para: determinar a extensão dos valores normais de MN em diferentes laboratórios e a influência de alguns factores que potencialmente afectam a frequência de MN, como a idade, o género, os estilos de vida; fornecer informações sobre o efeito de determinadas alterações no protocolo experimental; ser possível desenhar um protocolo específico para cada tipo de células; e para determinar, em que medida a frequência de MN pode ser considerada um biomarcador válido para o envelhecimento e para o risco de doenças como cancro (Fenech, Holland, Chang, Zeiger, & Bonassi, 1999).

Segundo um levantamento levado a cabo por Bonassi em 2009, foram identificados os desafios futuros para o projecto Humano de Micronúcleos, nomeadamente: definição das variáveis chaves, técnicas e epidemiológicas, que têm impacto sobre as frequências de micronúcleos em células do epitélio oral em populações humanas medidas usando os protocolos actuais não standarizados; projectar os estudos intra e interlaboratoriais necessários para quantificar essas variáveis e produzir protocolos padrão fiáveis e sólidos. O protocolo de um teste do micronúcleo exige: recolha e armazenamento de células orais ou utilização de células de uma linha celular; a sua preparação e coloração; a identificação do tipo de células, os diferentes indícios de alterações, registo de dados, análise dos dados e posterior relatório; determinar se a frequência de micronúcleos em células orais pode ser usada como previsão do desenvolvimento de cancro e de outras doenças degenerativas (Bonassi et al., 2009).

II. OBJECTIVO

O principal objectivo deste estudo consiste em verificar se os extractos das resinas compostas Filtek™ Bulk Fill, Tetric EvoCeram® Bulk Fill e Coltene Fill-Up!™ são citotóxicos e/ou genotóxicos para os fibroblastos de ratinho da linha celular 3T3.

Para tal a citotoxicidade será determinada através do ensaio do MTT e do ensaio do cristal violeta que permitirá determinar a diluição que provoca a morte de 50% das células (DL₅₀) e a genotoxicidade através do ensaio dos micronúcleos.

III. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

- Hipótese Nula (0) - Não há diferenças na viabilidade celular nem no número de micronúcleos ao nível dos fibroblastos de ratinho (linha celular 3T3) quando em contacto com os extractos das resinas compostas Filtek™ Bulk Fill, Tetric EvoCeram® Bulk Fill e Coltene Fill-Up!™.
- Hipótese 1 - Há diferença na percentagem de viabilidade celular mas não no número de micronúcleos ao nível dos fibroblastos gengivais de ratinho quando em contacto com os extractos das resinas compostas Filtek™ Bulk Fill, Tetric EvoCeram® Bulk Fill e Coltene Fill-Up!™.
- Hipótese 2 – Não há diferença na percentagem de viabilidade celular mas há no número de micronúcleos ao nível dos fibroblastos gengivais de ratinho quando em contacto com os extractos das resinas compostas Filtek™ Bulk Fill, Tetric EvoCeram® Bulk Fill e Coltene Fill-Up!™.
- Hipótese 3 - Há diferença na percentagem de viabilidade celular e no número de micronúcleos ao nível dos fibroblastos gengivais de ratinho quando em contacto com os extractos das resinas compostas Filtek™ Bulk Fill, Tetric EvoCeram® Bulk Fill e Coltene Fill-Up!™.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Resinas Compostas Bulk Fill

No presente estudo, foram testadas resinas compostas do tipo *Bulk Fill* de três marcas distintas (ver Figuras 1 a 3), utilizadas no âmbito da medicina dentária em tratamentos restauradores de dentisteria:

- R1- Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill
 - Monómeros presentes – UDMA, Bis-GMA, Bis-HEMA



Figura 1 - Apresentação comercial da resina R1 - Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill

- R2 - Filtek[™] Bulk Fill
 - Monómeros presentes – UDMA, Bis-GMA, Bis-HEMA



Figura 2 - Apresentação comercial da resina R2 - Filtek[™] Bulk Fill

- R3-Coltene Fill-Up![™]
 - Monómeros presentes – UDMA, Bis-GMA, TEGDMA



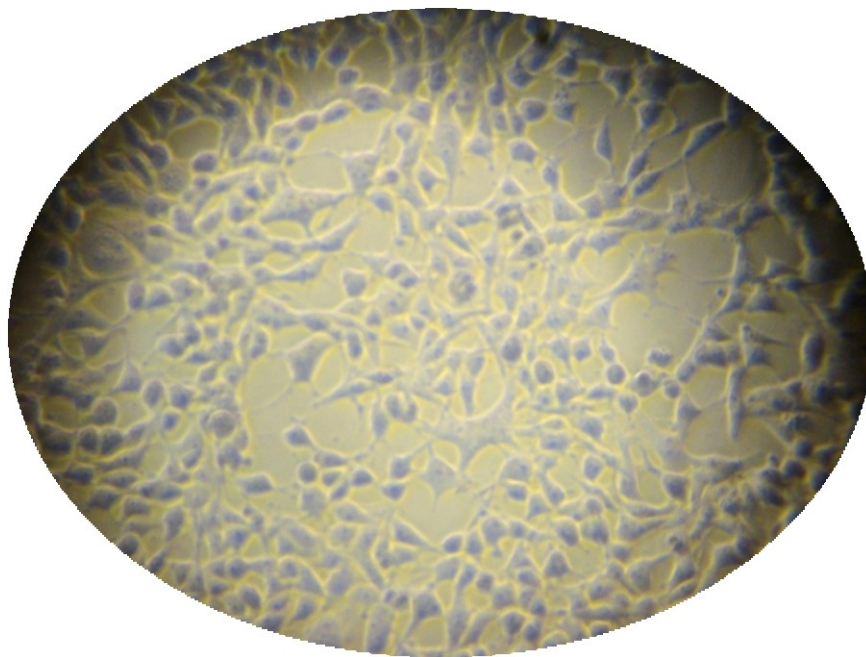
Figura 3 - Apresentação comercial da resina R3 - Coltene Fill-Up![™]

1.2. Linha celular

A linha celular escolhida para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos das resinas compostas bulk fill no presente estudo, foi uma linha celular de fibroblastos de ratinho, 3T3 (ATCC® CRL-1658™) (ver Figura 4).

Esta linha celular deriva de fibroblastos embrionários de ratinho e a sua escolha deveu-se ao facto destas células terem a capacidade de mimetizarem os fibroblastos existentes na gengiva humana (ISO 10993-5, 2009).

Uma vez que a aplicação das resinas se dá dentro da cavidade oral mantendo um contacto directo com o esmalte e com a dentina e aquando de restaurações infra ou justa gengivais estabelece um contacto directo com a mucosa gengival, optou-se por efectuar os ensaios de toxicidade nestas células, uma vez que já se mostraram eficazes no processo de determinação de toxicidade de outros materiais dentários.



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

1.3. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho estão caracterizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista de Reagentes

Reagente	Fonte	Referência
Mitomycin C from <i>Streptomyces caespitosus</i>	Sigma, Alemanha	M4287
Cytochalasin B from <i>Drechslera dematioidea</i>	Sigma, Alemanha	C6762
Giemsa	Merck, EUA	HX252083
Di-Sodium Hydrogen Phosphate	Merck, EUA	F1688186141
RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)	Gibco, Reino Unido	31870
Solução de <i>Tripan Blue</i> (0,4%); filtrado-esterilizado	Sigma, Reino Unido	T8154
Brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT)	Sigma, Reino Unido	M5655
Dimetilsulfóxido (DMSO); filtrado-esterilizado	Sigma, Reino Unido	D2650
Dimetilsulfóxido (DMSO); 99% puro	Merck, EUA	317275
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM); filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas	Sigma, Reino Unido	D5671
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Tampão fosfato, PBS) 10x; pH 6,0-7,0	Gibco, Reino Unido	14200059
Gentamicina 50mg/ml	Gibco, Reino Unido	15750037
NEM Non-essential Amino Acid Solution 100×; filtrado-esterilizado; testado para endotoxinas	Sigma, Reino Unido	M7145
Solução de Piruvato de Sódio 100mM (PNA)	Gibco, Reino Unido	11360039
Solução de anfoterizina B 250 µg/mL (Fungizona); filtrado-esterilizado	Sigma, Reino Unido	A2942
Solução L-glutamina-penicilina-streptomicina (200mM L-glutamina, 10000 U/mL Penicilina, 10 mg/mL Streptomicina); filtrada-esterilizada (penstrep-glu)	Sigma, Reino Unido	G6784
<i>Fetal Bovine Serum Gold</i> (FBS); pH 7,1	PAA, Áustria	A11-151
Tripsina de pâncreas suíno; pH 6,4-7,0	Sigma, Reino Unido	15090046
Cristal Violeta	Sigma, Reino Unido	C0775

2. Métodos

Todo o protocolo experimental de preparação das resinas compostas e de cultura de células foi efectuado numa câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dinamarca), de forma a assegurar as condições de assepsia exigidas para este tipo de ensaios. Todo o material utilizado estava esterilizado.

2.1. Preparação das Culturas celulares

Para iniciar todos os ensaios experimentais realizados nesta investigação científica, começou por se colocar as células em cultura, de forma a ter as células em condições ideais nos dias em que se iniciaram os ensaios.

O método de conservação de células consiste na colocação das células em criotubos, guardados a -80°C . Utilizou-se o conteúdo dos criotubos descongelando a suspensão celular em banho-maria a 37°C . Após o processo de descongelação estar concluído, o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo falcon, ao qual se adicionou 5ml de DMEM simples. Centrifugou-se a solução durante 3 minutos a 1000 rpm, de forma a retirar o DMSO, substância utilizada para conservar as células enquanto congeladas, ou seja, retirou-se o sobrenadante do falcon, o pellet, constituído pelas células, foi colocado num frasco de cultura de 25cm^2 (T25) juntamente com 6mL de meio de cultura completo.

A manutenção da cultura de células foi feita através do seu plaqueamento em frascos de cultura 25cm^2 (Sarstedt) no seguinte meio de cultura: DMEM (Sigma, Reino Unido) suplementado com 10% de soro FBS Gold (PAA, Austria), 1% de PNA 100mM (Gibco, Reino Unido), 1% Fungizona $250\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Reino Unido), 1% NEM 100x (Sigma, Reino Unido), 1% de solução de penstrep-glu (Sigma, Reino Unido) e 0,1% de gentamicina 50mg/mL (Gibco, Reino Unido) (ATCC, 2013).

Seguidamente, as células foram incubadas a 37°C , numa atmosfera humidificada com 5% CO_2 até se atingir uma confluência de cerca de 80%, alcançada esta confluência realizaram-se sub-culturas. Estas sub-culturas obtêm-se através da cultura mãe através de um processo inicial de tripsinização, onde se provoca a hidrólise das proteínas que fazem a adesão das células à parede dos frascos de cultura, possibilitando então o destacamento das células. Para isto, fez-se a aspiração do meio de cultura

celular, lavagem das células com tampão fosfato (PBS) 0,01M e posterior adição de uma solução de tripsina a 0,25mg/mL (ATCC, 2013). A tripsinização fez-se a 37°C, durante 2 minutos na estufa, após a qual foi adicionado meio não suplementado para diluição da tripsina e posterior centrifugação das suspensões celulares obtidas (3 min a 192 x g) (centrifuga Sigma, modelo 3-16 PK). Os sedimentos celulares resultantes foram colocados em meio de cultura suplementado e foi feita a contagem do número de células, utilizando 10µL de células e 10µL de solução de *tripan blue*, neste processo as células vivas adquirem uma coloração azul, sendo então colocadas na câmara de Neubauer, modelo 8100104 Hirschmann Neubauer-improved (Hirschmann, Alemanha). Seguidamente é iniciada a contagem celular, na área correspondente aos 16 quadrados visíveis, através da sua observação no microscópio óptico (ver Figura 5).

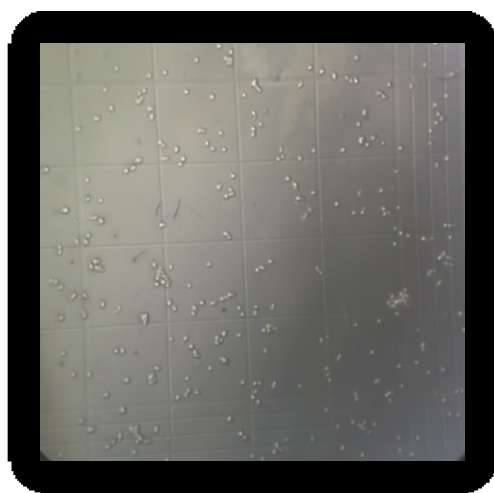


Figura 5 - Imagem de Microscopia Óptica representativa das células 3T3 presentes numa placa de Neubauer

A renovação do meio de cultura presente nos frascos de incubação (T25) foi feita conforme a confluência apresentada pelas células.

Em casos de excesso de número de células, procedeu-se ao congelamento de células viáveis, de modo a serem reaproveitadas para futuros ensaios experimentais. Esta acção consiste em ressuspender as células confluentes de um T25 em 800µl de DMEM simples, 100µl de soro e 100µl de DMSO. Após esta preparação a suspensão é colocada num criotubo e é congelada lentamente, colocando inicialmente o tubo a -20°C durante cerca de 12horas e em seguida é transferindo-o para um refrigerador a -80°C.

2.2. Preparação das resinas

As resinas compostas foram manipuladas de acordo com o fabricante, sendo aplicadas camadas de resina num molde de metal com poços de 4mm de altura e 4mm de diâmetro (ver Figura 6) e posteriormente, a resina colocada em cada um destes cilindros foi fotopolimerizado com o fotopolimerizador de alta intensidade Elipar™ DeepCure-S LED (3M, ESPE) (Intensidade: 1470 mW/cm² (-10%/+20%); comprimento de onda: 430-480 nm), durante o tempo indicado pelos respectivos fabricantes: R1 - 10 segundos, R2 - 20 segundos e R3 - 5 segundos.

Após a fotopolimerização, os cilindros de resina (ver Figura 7) foram individualmente exportados do molde metálico para um um falcon contendo meio de cultura, numa razão de 6 cilindros para 1,5ml de meio, onde incubaram durante 24h, sendo estas soluções seguidamente filtradas num filtro de 25µm, para preparação dos extractos eluídos potencialmente citotóxicos.

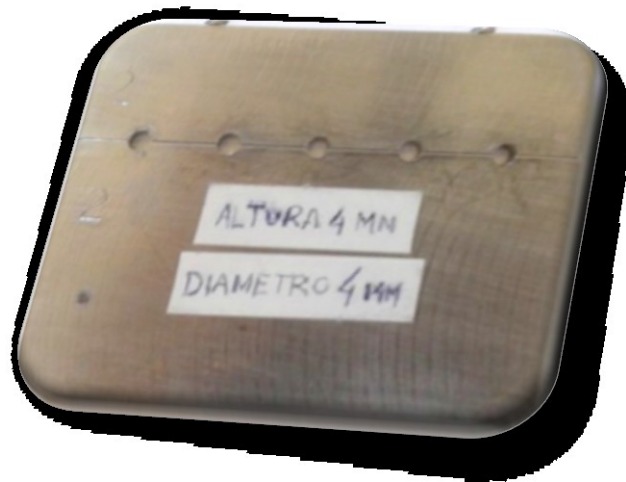


Figura 6 - Molde Metálico utilizado para a confecção dos cilindros das diferentes resinas



Figura 7 - Cilindros resultantes da polimerização das diferentes resinas

2.3. Ensaio do MTT

De modo a definir qual a concentração inicial de células ideal para a realização dos ensaios, foi efectuado um ensaio experimental com 3 quantidades de células: 1×10^4 , 2×10^4 e 5×10^4 , com oito réplicas para cada quantidade, cada uma das réplicas corresponde a um dos 8 poços da mesma coluna de uma placa de 96 poços. Adicionalmente, colocou-se DMSO nos 8 poços de uma coluna que servirá de branco, para as leituras no espectrofotómetro e nos 8 poços de uma outra coluna colocou-se uma solução de etanol 70%, representativa do controlo positivo que provoca a morte de todas as células. Os valores de absorvância a 595 nm são obtidos pelo leitor de microplacas (Bio-Rad, EUA).

Após a optimização do número de células a utilizar no ensaio do MTT, efectuou-se então o ensaio com os extractos eluídos das resinas e com o número de células escolhido através do ensaio anterior. Para este ensaio os fibroblastos 3T3 foram cultivados numa placa de cultura de 96 poços, a uma concentração de 5×10^4 células em 200 μ l de DMEM suplementado, e incubados durante 24h a uma temperatura de 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

Após as 24h, as células atingiram uma confluência de 50%, removeu-se o meio de cultura que esteve em contacto com as células e foram adicionados 200 μ l, de diferentes diluições dos extractos eluídos das diferentes resinas preparadas como indicado na Tabela 2, para definir a dose letal média (DL₅₀) de cada uma das resinas.

Tabela 2 - Volumes utilizados nas diferentes diluições dos extractos eluídos das Resinas

Concentração Relativa dos Extractos (%)	Extrato Eluído das Resinas (μl)	DMEM (μl)
75	150	50
60	120	80
50	100	100
20	40	160
10	20	180
5	10	190
1	2	198
0,5	1	199

Simultaneamente, nos poços dos controlos negativos (0% de morte celular) foram adicionados 200µl de DMEM suplementado às células e nos poços dos controlos positivos (100% morte celular) foram adicionados 200 µl de Etanol 75% às células, que foram de seguida incubadas por mais 24h.

Passadas 24h, em que as células estiveram em contacto com o material possivelmente tóxico, estas foram lavadas com DMEM simples e foi adicionado 200µl de solução de MTT (MTT a 0,5mg/mL em DMEM suplementado) por poço. A placa foi incubada durante 2,5h a uma temperatura de 37°C. Após este período formaram-se os cristais de formazan (Figura 8). As células foram cuidadosamente lavadas com PBS 0,01M pH 7,4, para evitar a perda dos cristais de formazan e finalmente foram adicionados 200µl de DMSO em cada poço para homogeneizar e dissolver os cristais de formazan formados.



Figura 8- Cristais de Formazan produzidos durante o ensaio do MTT (Em cada um dos poços observa-se um precipitado escuro que corresponde aos cristais de formazan)

O ensaio conclui-se após a leitura da absorvância a 595nm dos poços no leitor de microplacas Model 680 (Bio-Rad, EUA). Feita esta leitura é subtraído o valor de absorvância obtido para o poço que só contém DMSO. O valor da leitura de absorvância do controlo negativo corresponde ao valor das culturas onde há 0% de morte celular ou seja 100% de viabilidade celular (Malkov *et al.*, 2010).

2.4. Ensaio do Cristal Violeta

Neste ensaio utilizaram-se também placas de 96 poços onde se incubaram as células. Em três dos poços não foram colocadas células mas sim apenas meio de cultura para servir de branco. A quantidade de meio de cultura por poço é de 200µl de forma a prevenir possíveis efeitos de evaporação. A quantidade de células por poço foi de 5×10^4 . As células foram então incubadas durante 24h a 37°C, para permitir a adesão das células aos poços.

Após as 24h de incubação, o meio foi aspirado dos poços e substituído por meio suplementado e o extrato das resinas em diferentes concentrações de acordo com o representado na Tabela 1.

As células ficam em contacto com soluções dos extratos de resina durante mais um dia, e, após esse período o meio é aspirado dos poços e procede-se à sua lavagem com duas aplicações de 200µl de PBS em cada poço, sendo de seguida retirado cuidadosamente, invertendo a placa dos poços sobre um papel absorvente, de forma a eliminar toda a solução dos poços.

Em seguida as células são fixadas nas paredes dos poços com 100 µl de etanol a 96% gelado durante 10min. Após a fixação, adicionam-se 100 µl da solução corante do cristal violeta a 0,1%, que consiste em pó de cristal violeta (Sigma-Aldrich) diluído em água destilada e etanol a 96%, esta solução é guardada à temperatura ambiente num frasco escuro e apresenta uma validade de 2 meses. Após a adição do corante incubam-se as culturas por 10 minutos a uma temperatura ambiente, com agitação de cerca de 20 oscilações por minutos para facilitar a impregnação do corante nas células.

Lavam-se quatro vezes os poços para retirar o excesso de corante como foi feito anteriormente neste ensaio. Adiciona-se 200µl de etanol a 96% e ácido acético a 1% em cada poço, e incuba-se durante 30min à temperatura ambiente, fazendo oscilações suaves na placa, como havia sido feito anteriormente.

Por fim a placa está pronta para ser lida no leitor de absorvâncias, a 595nm (ver Figura 9). A média da absorvância obtida nos poços que não tinham células é subtraída aos valores obtidos nos outros poços, de forma a eliminar o valor resultante da absorvância do meio de cultura. A média dos valores de absorvância obtidos nos poços que continham as células que não foram expostas aos extractos das resinas equivale a 100% de viabilidade celular neste ensaio. De seguida determina-se o valor das percentagens de células viáveis para as diferentes concentrações dos extractos eluídos de cada resina através de uma recta de calibração que une os valores de 100% de morte (controlo Positivo) com os valores de 0% de mortes.

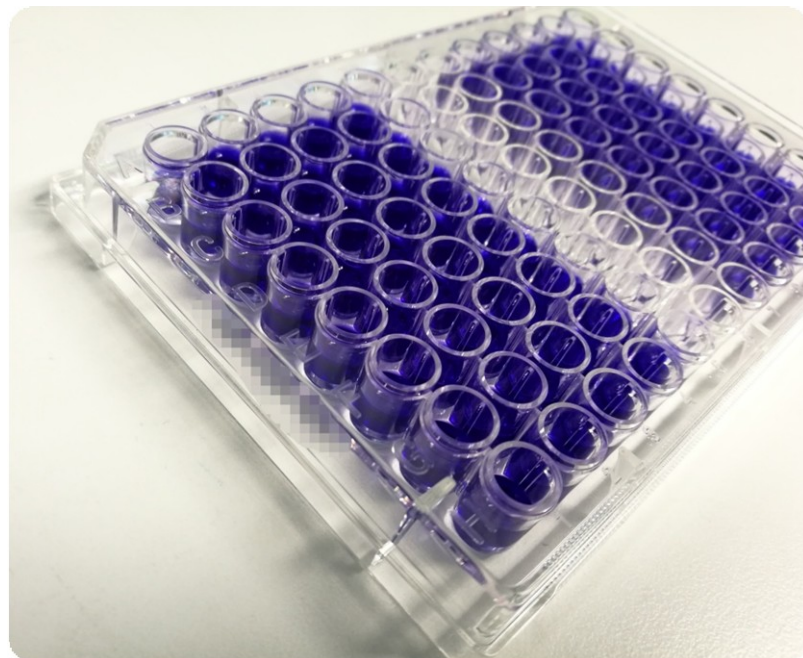


Figura 9 - Resultado típico do ensaio de CV (O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, em que os 8 poços de cada coluna correspondem a uma condição a testar)

2.5. Ensaio do Micronúcleo

Tendo sido definida a dose letal média das células (DL_{50}) para cada uma das resinas com os ensaios experimentais efectuados previamente, dá-se início ao ensaio dos micronúcleos. Para a realização deste ensaio as células foram cultivadas em frascos de incubação T25, começando com uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células em 5ml de meio de cultura e incubadas por um período de 48 horas a 37°C , numa atmosfera humidificada com 5% de CO_2 .

Passadas as 48h de proliferação, as células foram expostas aos extractos, na concentração DL_{50} , específicas para cada uma das diferentes resinas, preparadas de acordo com o representado na tabela 3. No controlo negativo não se adicionou extracto de resina, e no controlo positivo adicionou-se 12,5 μl de solução de Mitomicina c, a uma concentração de 0,75 μM , que vai promover a formação de micronúcleos.

Tabela 3 - Volumes utilizados para preparação das diluições dos extractos correspondentes à DL_{50} utilizadas no ensaio do MN

DL_{50} dos extractos (%)	DMEM suplementado (ml)	Solução de resina (ml)
R1 – 50	2,5	2,5
R2 – 60	2	3
R3 – 20	4	1

No terceiro dia do ensaio, o meio de cultura é removido e as células são lavadas com 5ml de DMEM não suplementado, de seguida adicionam-se 5ml de DMEM suplementado às células e adiciona-se 150 μl da solução de citocalasina B com uma concentração final de 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por T25, originada de uma solução *stock* de 5mg/ml.

A citocalasina B é um bloqueador da citocinese, inibe a polimerização de actina e evita a formação do anel contráctil, e assim, impede a separação das células filhas após a mitose, conduzindo à formação de células binucleadas. As células não sofrem o processo citocinético, sendo posteriormente possível a sua observação na fase pré-citocinética.

Ao fim de 20h de incubação com citocalasina B, as células são tripsinizadas e lavadas com RPMI 1640 suplementado com 2% de soro, são centrifugadas, são

submetidas a um choque hipotónico com RPMI 1640 suplementado diluído com água estéril, numa solução de 1:4, durante cerca de 2 minutos. Centrifuga-se novamente, descarta-se o sobrenadante e através do pellet de células efectuam-se esfregaços em lâminas (Marienfeld, 1000612, Alemanha). Por cada cultura, exposta a diferentes diluições dos extractos das resinas, são efectuados esfregaços em quatro lâminas. As lâminas ficam 24h a secar e posteriormente são fixadas durante 30 minutos com metanol a -20°C , as lâminas ficam novamente 24h a secar e são então coradas com uma solução de Giemsa a 4% com tampão fosfato a 0,01M de pH 6,8, durante 8 minutos, sendo excesso retirado com água (Bandarra et al., 2013).

No final da preparação das lâminas, pode-se iniciar a sua observação ao microscópio óptico (Optika B-350, Itália), passando então à sua contagem de células binucleadas (BN) e binucleadas com micronúcleos.

2.6. Análise Estatística

Para executar a análise estatística destes estudos foram utilizados o *software* Microsoft Office Excel 2007 e SPSS (IBM SPSS Statistics, versão 24.0, EUA).

Com os resultados de MTT e de Cristal Violeta obtidos através da leitura no espectrofotómetro (ver anexo MTT e anexo Cristal violeta), foi feita a média dos resultados de cada concentração de resina por poço e o seu respectivo desvio padrão, a essa média foi eliminado o valor obtido na média das colunas do branco, correspondendo ao DMSO. O controlo negativo serviu para identificar a nossa viabilidade máxima, sendo a sua média equivalente à nossa percentagem de 100%, com esta percentagem como base, calculou-se a percentagem da viabilidade celular para todas as resinas às diferentes concentrações, sendo assim possível aferir a que percentagem de tóxico se expressa a dose letal de cada resina.

De modo a verificar a normalidade das variáveis dos resultados obtidos com os ensaios do MTT e com os ensaios do Cristal violeta, aplicou-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Por fim, para comparar os valores obtidos entre as diferentes resinas e as diferentes concentrações, foi utilizado o teste paramétrico, ANOVA *two-way*.

Para a avaliação da genotoxicidade foi apenas contabilizado o número total de micronúcleos em 1000 células BN (MN/1000BN) (Michael Fenech, 2000; OCDE, 2010).

V. RESULTADOS

1. Polimerização das Resinas

A polimerização das resinas foi feita nas condições indicadas pelos fabricantes, nomeadamente quanto ao tempo de exposição aos UV. Verificou-se que as três resinas adquiriam consistências diferentes após a fotopolimerização.

A R2 apresenta uma consistência semelhante à das resinas convencionais, equivalente a uma polimerização aparentemente completa.

A R1 mostrou-se com uma consistência menos firme que R2, após os seus 10 segundos de fotopolimerização, sugerindo que a polimerização foi incompleta.

Por sua vez, a R3 apresenta uma boa consistência na superfície que esteve directamente em contacto com a luz, contudo, a superfície que não esteve directamente em contacto com a luz mostrou-se pastosa, sugerindo também uma polimerização incompleta.

2. Citotoxicidade

2.1. Optimização do Número de Células

Como descrito anteriormente, antes de iniciar os ensaios experimentais de citotoxicidade, foi feito um ensaio de MTT prévio, para aferir qual o número de células necessário inserir em cada poço da placa de 96 poços para que no fim do ensaio as leituras de absorvância estejam dentro dos limites de validade do espectrofotómetro. Nos ensaios de MTT, nos poços sem a presença de tóxicos, as células estão aderentes e confluentes, dando no final do ensaio origem a valores de absorvância que correspondem a 100% de viabilidade celular.

Os resultados dos ensaios de MTT com diferentes concentrações celulares, sem exposição às resinas, mostram um aumento dos valores de absorvância correspondente ao aumento de concentração inicial de células colocadas por poço (Tabela 4). Concluiu-se que para os ensaios de MTT, a melhor concentração inicial de células por poço é de

5×10^4 de células, pois a esta concentração obtém-se um valor de absorvância elevado (superior a 1,000 lido a 595nm), que corresponderá a 100% de viabilidade celular.

Tabela 4 - Valores de absorvância obtidos no ensaio de otimização do número de células para ensaios de citotoxicidade

Número de Células por poço	1×10^4	2×10^4	5×10^4
Valores de Absorvância a 595nm	0,32	0,83	1,4
	0,34	0,92	1,3
	0,31	0,97	1,2
	0,24	0,81	1,3
	0,18	0,79	1,2
	0,45	0,77	1,3
	0,31	0,80	1,2
	0,24	0,95	1,3
Média \pm Desvio Padrão	$0,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$

2.2. Ensaio do MTT

Após a otimização do número de células para o ensaio do MTT, realizou-se o ensaio com as células expostas a várias diluições dos extratos das resinas para aferir qual a DL_{50} correspondente a cada uma das 3 resinas. A tabela 5 mostra os valores do Branco, que representa os valores de absorvância dos poços apenas com DMSO, sem células, o valor da média do Branco é posteriormente subtraído de todas as médias de absorvância obtidas tanto nos controlos como nas células expostas às diluições das resinas, de forma a obter apenas os valores de absorvância dos cristais de formazan formados sem o valor do seu diluente (o DMSO), estes valores estão representados como Média Corrigida. O controlo negativo corresponde aos valores de absorvância obtidos nos poços que apenas continham células, sem exposição a agentes tóxicos, do qual se retira o valor de 100% de viabilidade celular, por conseguinte, também a percentagem de redução máxima de MTT, sendo com base neste valor calculadas as percentagens de viabilidade celular para todas as amostras. Os resultados de absorvância obtidos no ensaio de MTT encontram-se em anexo. O tratamento destes valores é apresentado nas Tabelas 6, 7 e 8 e na Figura 10. Verifica-se que a citotoxicidade das soluções aumenta proporcionalmente com o aumento da percentagem de tóxico. Verifica-se que a DL_{50} para a R1 corresponde à concentração de 50% do eluado puro,

para R2 corresponde à concentração de 60% e para R3 à de 20%. Isto significa que a resina mais citotóxica é a R3, seguida da R1 sendo a R2 a menos citotóxica.

Tabela 5 - Valores do controlo Negativo no Ensaio do MTT

	Controlo Negativo	Branco (DMSO)
Média ± Desvio Padrão	1,1 ± 0,2	0,1 ± 0,01
% Redução de MTT	100	-

Tabela 6 - Média dos valores de absorvência obtidos na presença dos eluados de R1-Ensaio do MTT

R1 - Tetric EvoCeram® Bulk Fill								
Concentrações Relativas (%)	75	60	50	20	10	5	1	0,5
Média Corrigida	0,50	0,52	0,55	0,61	0,65	0,67	0,72	0,79
±	±	±	±	±	±	±	±	±
Desvio Padrão	0,04	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,05
Viabilidade Celular (%)	46	48	51	56	59	61	66	72

Tabela 7 - Média dos valores de absorvência obtidos na presença dos eluados de R2-Ensaio do MTT

R2 - Filtek™ Bulk Fill							
Concentrações Relativas (%)	75	60	50	20	10	1	0,5
Média	0,43	0,55	0,66	0,67	0,69	0,71	0,81
±	±	±	±	±	±	±	±
Desvio Padrão	0,02	0,01	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04
Viabilidade Celular (%)	39	51	60	62	63	65	75

Tabela 8 - Média dos valores de absorvência obtidos na presença dos eluados de R3-Ensaio do MTT

R3 - Coltene Fill-Up!™							
Concentrações Relativas (%)	75	50	20	10	5	1	0,5
Média	0,39	0,53	0,55	0,63	0,67	0,75	0,75
±	±	±	±	±	±	±	±
Desvio Padrão	0,05	0,05	0,06	0,04	0,05	0,06	0,05
Viabilidade Celular (%)	35	49	51	57	61	69	69

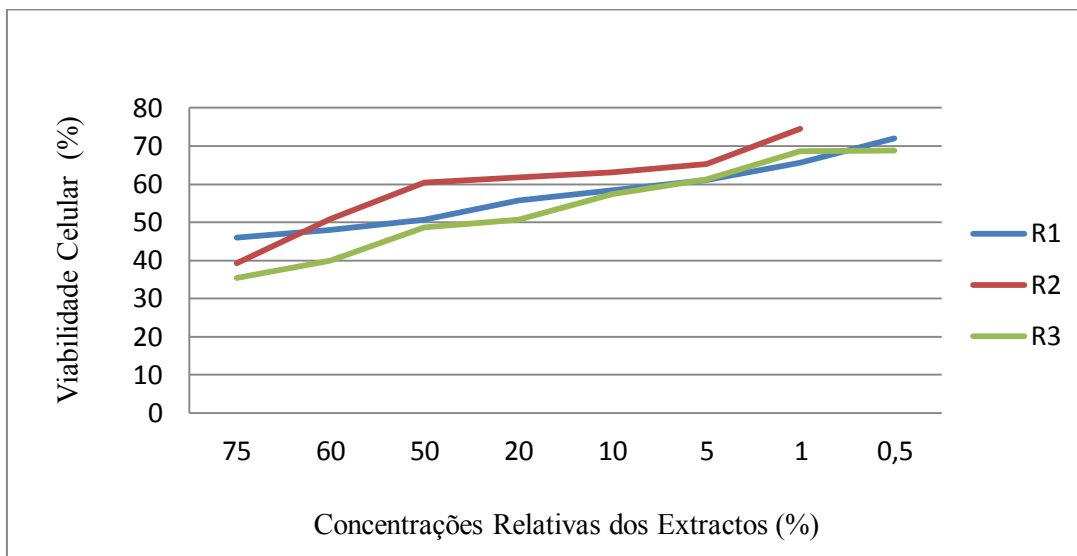


Figura 10 - Resultados da Viabilidade celular em função de diferentes concentrações relativas dos extractos eluídos no ensaio do MTT

Para avaliar as hipóteses em estudo efectuou-se uma análise estatística dos resultados dos ensaios no SPSS. De modo a verificar a normalidade da distribuição das amostras foi aplicado o teste *kolmogorov-smirnov* aos valores das leituras da absorvância das diferentes concentrações das três resinas (ver anexos). Com a aplicação deste teste verificou-se que todas as concentrações apresentavam uma distribuição normal, excepto a concentração de 0,5% em R1 e a de 1% em R2, sendo a sua distribuição considerada muito próxima da normal. Através do teste *ANOVA two-way*, avaliando a viabilidade celular obtida por concentração verifica-se uma resposta celular dose-dependente comprovada estatisticamente. Relativamente às diferenças entre concentrações, todas se mostraram diferentes entre si, exceptuando os valores obtidos nas concentrações de 0,5% e de 1%, sendo isto justificado pelo facto das concentrações serem de valores muito próximos.

Analisando a viabilidade celular na presença das 3 resinas verifica-se também diferenças entre todas elas. Isto é, tanto a concentração utilizada como a exposição aos extractos das diferentes resinas influenciam a citotoxicidade, contudo a concentração do extrato aplicado exerce uma maior influência na resposta celular do que o tipo de resina.

2.3. Ensaio do Cristal Violeta

Paralelamente aos ensaios do MTT foram efectuados os ensaios do cristal violeta, de forma a verificar se os resultados de citotoxicidade são equivalentes entre os dois. Os valores de absorvância obtidos a 595 nm estão em anexo.

Na tabela 9, à semelhança do que foi feito no ensaio do MTT, também se aferiu o valor de absorvância do DMSO, correspondente ao Branco do estudo e os valores do controlo negativo, adquirindo através destes resultados o valor da percentagem máxima de viabilidade celular.

Através das tabelas 10, 11 e 12 e Figura 11, constata-se que as concentrações relativas dos extractos às quais se atinge a dose letal média das resinas R1 e R3 é equivalente nos dois ensaios, no entanto para a resinas R2 a DL₅₀ foi atingida na na concentração relativa do extracto de 75%, diferente da concentração relativa do extracto de 70%, definida como a DL₅₀ determinada pelo ensaio do MTT.

Tabela 9- Ensaio do CV - Valores do Controlo Negativo

	Controlo Negativo	Branco (DMSO)
Média ± Desvio Padrão	2,7 ± 0,1	0,1 ± 0,01
% Redução de MTT	100	-

Tabela 10 - Média dos valores de absorvância obtidos na presença dos eluados de R1- Ensaio do CV

R1 - Tetric EvoCeram® Bulk Fill							
Concentração Relativa (%)	75	60	50	20	10	5	1
Média	1,1	1,2	1,3	1,6	1,8	2,0	2,1
±	±	±	±	±	±	±	±
Desvio Padrão	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,6
Viabilidade Celular (%)	43	47	51	61	71	79	83

Tabela 11 - Média dos valores de absorvência obtidosna presença dos eluados de R2 - Ensaio do CV

R2 - Filtek™ Bulk Fill							
Concentração Relativa (%)	75	60	50	20	10	5	1
Média	1,3	1,5	1,6	1,8	1,9	2,0	2,1
±	±	±	±	±	±	±	±
Desvio Padrão	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,6
Viabilidade Celular (%)	49	57	61	69	74	79	83

Tabela 12 - Média dos valores de absorvência obtidosna presença dos eluados de R3 - Ensaio do CV

R3 - Coltene Fill-Up!™					
Concentração Relativa (%)	50	20	10	5	1
Média	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6
±	±	±	±	±	±
Desvio Padrão	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
Viabilidade Celular (%)	46	49	57	59	64

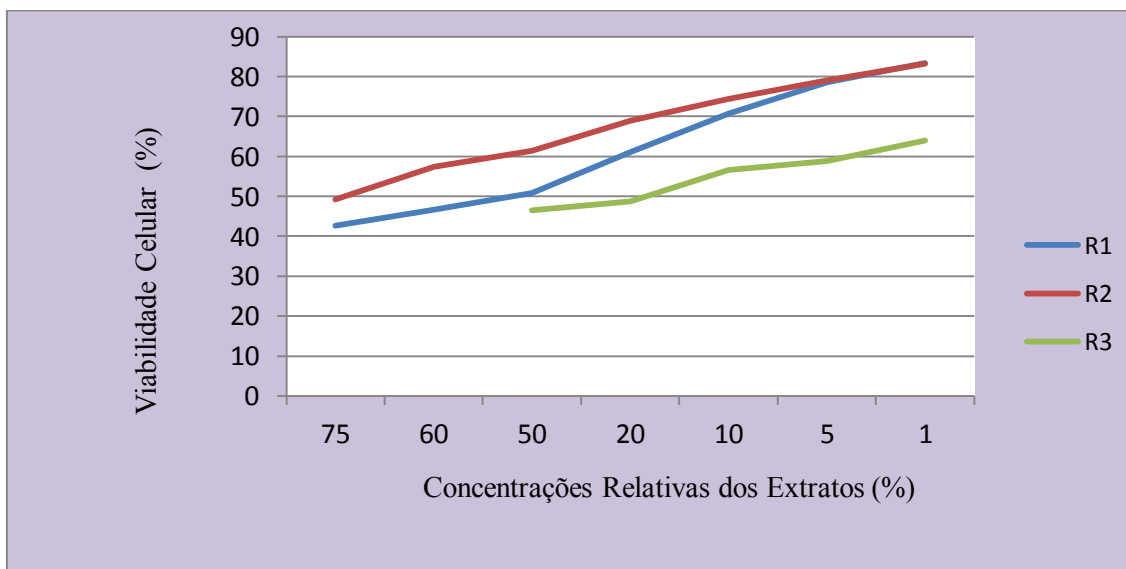


Figura 11- Resultados da Viabilidade celular em função de diferentes concentrações relativas dos extractos eluídos no ensaio do CV

Através da análise estatística no SPSS, verifica-se que as concentrações relativas dos eluados de 10% para R1 e 5% para R3 não seguem uma distribuição normal e que não há diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de 60 e 50%.

3. Genotoxicidade

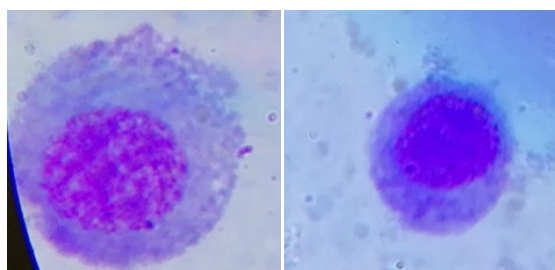
3.1. Ensaio do MN

Foram efectuados dois ensaios experimentais independentes de forma a validar os resultados obtidos. As células foram expostas aos extractos (DL₅₀) dos três diferentes tipos de resina. Em paralelo, por ensaio, fez-se um controlo positivo, onde as células foram expostas a mitomicina c, substância que provoca a formação de micronúcleos e fez-se também um controlo negativo em que as células não foram expostas a qualquer agente tóxico.

Os resultados apresentados na Tabela 13 e Figura 13 mostram, como era expectável, que no controlo negativo não foram encontrados micronúcleos e que por sua vez no controlo positivo (na presença de mitomicina) foi possível observar várias células binucleadas com a presença de micronúcleos (Tabela 13 e Figuras 13). Nalgumas lâminas foi também possível observar algumas células mononucleadas, que não se encontravam em processo de citocinese, não sendo por isso contabilizadas para o estudo (Figura 12).

Tabela 13- Contagem Celular dos Controlos do Ensaio do MN

	Controlo Positivo 1	Controlo Positivo 2	Controlo Negativo 1	Controlo Negativo 2
BN com MN	90	164	-	-
Binucleada	1000	1000	1000	1000



**Figura 12 - Células 3T3 Mononucleadas, microscópio óptico Optika B-350 (Itália)
(Ampliação 1000x)**

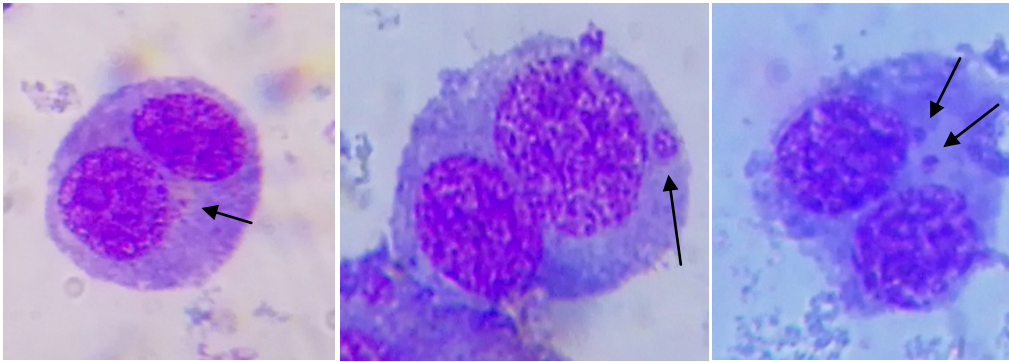


Figura 13 - Células 3T3 Binucleadas com MN, microscópio óptico Optika B-350 (Itália)
(Ampliação 1000x)

As restantes lâminas continham células que foram expostas à dose letal, definida com os ensaios de citotoxicidade, das três resinas em estudo. Ao observar ao microscópio óptico estas lâminas, nota-se imediatamente que as células têm uma configuração diferente das observadas nos controlos. Nestes grupos a contagem focava a presença de micronúcleos para determinar a percentagem de células com micronúcleos, na presença das 3 resinas foram encontradas em todas as células alterações na morfologia nuclear compatível com fragmentação porém não compatível com micronúcleo (Tabela 14 e Figura 14).

Tabela 14 - Contagem Celular de R1, R2 e R3 do Ensaio do MN

	R1 (1)	R1 (2)	R2 (1)	R2 (2)	R3 (1)	R3 (2)
Binucleada	1000	1000	1000	1000	547	560
BN com MN/ fragmentações	1000	1000	1000	1000	547	560

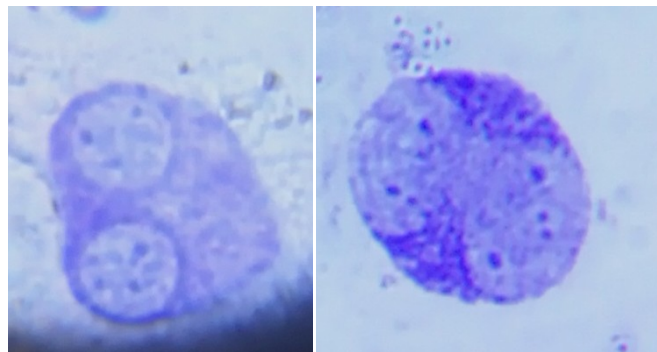


Figura 14 - Células 3T3 Binucleadas com vários MN, microscópio óptico Optika B-350 (Itália)
(Ampliação 1000x)

Através da Tabela 14 e Figura 15, verifica-se que não foi alcançada a contagem mínima de 1000 células na R3 e dado que todos os ensaios se iniciaram com o mesmo número de células em cultura para cada uma das resinas este resultado sugere que muitas células morreram durante o ensaio, mesmo estando a exposição ao tóxico calibrada para a DL_{50} de a cada uma das resinas.

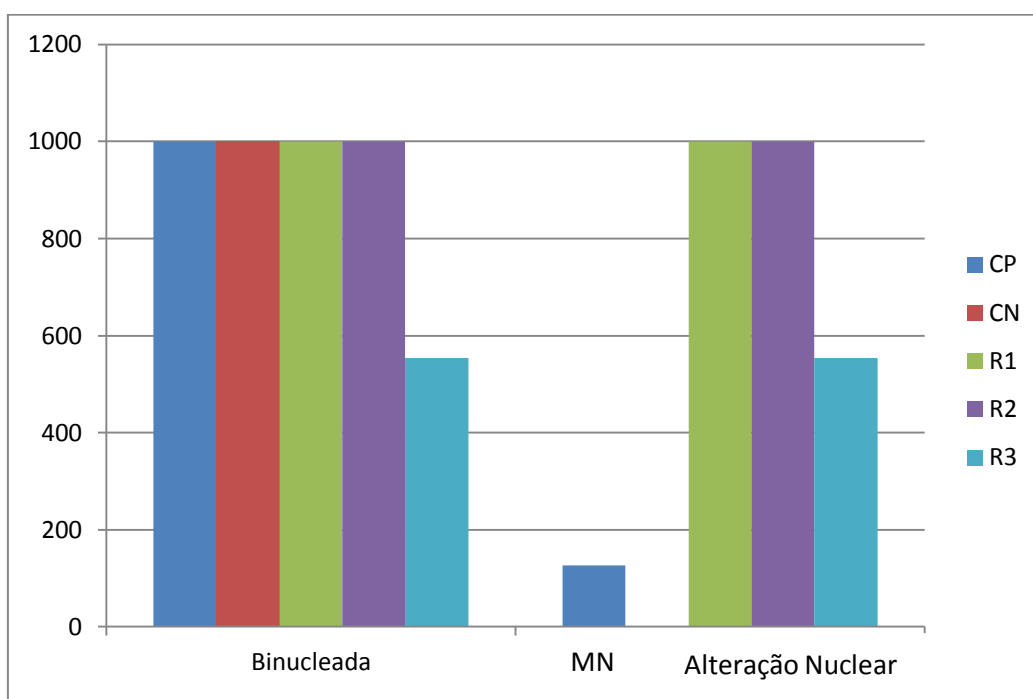


Figura 15 - Número de Células vs Tipo de Célula

Os resultados mostram que os extractos das 3 resinas induzem alterações morfológicas nos núcleos celulares, não sendo contudo estas as diferenças obtidas expectáveis no ensaio dos micronúcleos. Apesar de nos controlos de mitomicina se encontrarem células com micronúcleos, este facto só se observa em cerca de 10% das células enquanto nos ensaios na presença dos extractos das resinas, a percentagem de células com alterações morfológicas dos núcleos é de 100%.

VI. DISCUSSÃO

1. Citotoxicidade

A citotoxicidade das resinas compostas *Bulk Fill* foi avaliada e definida através dos ensaios do MTT e do Cristal Violeta.

Aquando da preparação dos cilindros de resina, foi possível constatar diferenças entre cada uma das resinas utilizadas:

- A R2 após a fotopolimerização apresenta uma consistência dura, compatível com uma polimerização completa, semelhante às resinas compostas convencionais.
- Por sua vez a R1, após a sua fotopolimerização apresenta uma dureza menos consistente que a R2, o que nos leva a crer que talvez os 10 segundos de fotopolimerização poderiam ser aumentados.
- Por fim, após os 5 segundos de fotopolimerização, recomendados pelo fabricante da R3, obtém-se uma resina com a superfície que teve exposição directa à luz dura, mas os dois últimos milímetros de profundidade do cilindro encontra-se sob uma forma pastosa. No entanto, o fabricante afirma que esta resina é de dupla polimerização, pelo que a resina atinge a sua consistência final após 3 minutos, correspondentes à autopolimerização do material. Esta situação implica o contacto da estrutura dentária com os monómeros da resina composta antes da sua conversão em polímero, sendo esta a possível causa da maior citotoxicidade desta resina. Esta resina ao contrário de R1 e R2, tem na sua constituição monómeros de TEGDMA sendo este monómero dos presentes nas resinas compostas dos mais citotóxicos (Urcan et al., 2010). Neste caso é o mais citotóxico de todos, avaliando apenas a composição das três resinas utilizadas neste estudo.

Com base nos resultados obtidos, é possível observar que a toxicidade destes materiais é dose dependente. Em ambos os ensaios, MTT e CV, verificou-se uma citotoxicidade crescente de R2, para R1, sendo a R3 a mais citotóxica uma vez que foi a

resina com uma dose letal de 50% associada a uma menor diluição do extracto da resina.

A diluição da dose letal de 50% dos extractos da R2 é diferente quando determinada pelo ensaio do MTT em comparação com o ensaio de Cristal Violeta. Esta ligeira diferença nos valores pode estar relacionada com o facto do ensaio do cristal violeta apenas aferir a morte celular associada às alterações na membrana celular enquanto o ensaio do MTT analisa a actividade metabólica da enzima presente na mitocôndria, ou seja, isto pode significar que a R2 antes de provocar a morte por disrupção da membrana, afecta e inviabiliza o metabolismo celular a nível da respiração celular, alterando a homeostasia celular.

A morte celular é dependente da concentração e do tempo para qualquer produto químico (Ratanasathien et al., 1995).

Há estudos que mostram que o efeito citotóxico das resinas compostas é maior no segundo dia de exposição das células aos extractos, referindo ainda que, no entanto, após sete dias de exposição as resinas compostas perdem o seu efeito citotóxico (Nalçaci, Oztan, & Yilmaz, 2004). Por este motivo, seria interessante avaliar novamente os resultados citotóxicos ao segundo dia de exposição das células aos extractos das resinas e ainda ao sétimo dia.

Uma boa polimerização é um factor essencial para garantir a maximização da performance das propriedades físicas e clínicas das resinas compostas. A citotoxicidade tem sido atribuída à presença residual de monómeros e oligómeros não polimerizados.

Têm sido observadas correlações fortes e significativas entre a eficácia da polimerização (razão de dureza) e a citotoxicidade. Lim et al., (2016) fizeram um estudo onde concluíram que ao utilizar os tempos de fotopolimerização indicado pelos fabricantes, as resinas *Bulk Fill*, nomeadamente a SDR da Dentsply, não apresentam valores de citotoxicidade relevantes para a saúde do hospedeiro.

Ergun (2011) estudou diferentes tipos de fotopolimerização a diferentes distâncias. Na sua investigação utilizou resinas compostas convencionais (Grandio ®, Voco; Filtek™ Z250, 3M ESPE; Clearfil™ AP-X, Kuraray Co. Ltd; Aelite™ LS, Bisco Inc. and Simile ®, Pentron), onde aferiu que quando as resinas são polimerizadas com luzes de alta intensidade o tempo necessário para uma polimerização completa diminui. Viu também que resinas menos viscosas apresentam maior percentagem de

grau de conversão de monómeros dado o aumento de mobilidade das moléculas, facilitando a sua polimerização (Ergun et al., 2011). A otimização da fotopolimerização representa uma das bases da origem das resinas *Bulk Fill*, uma vez que estas são polimerizadas com fotopolimerizadores de alta intensidade e num menor período de tempo que as resinas compostas convencionais.

Lagocka (2015) estudou os extractos obtidos a partir de uma resina *Bulk Fill* em cromatografia líquida de alta eficiência. No seu estudo concluiu que a citotoxicidade destas resinas compostas está relacionada com a quantidade de TEGDMA eluído. Após a fotopolimerização da resina composta, verifica-se uma grande libertação de TEGDMA, iniciando-se desde as primeiras horas de colocação da resina uma toxicidade directa nas células da polpa dentária (Lagocka et al., 2015).

Segundo Cebe et al. (2015), contrariamente ao que vários outros estudos concluem, a libertação de monómeros residuais de resinas *Bulk Fill* (particularmente a Tetric EvoCeram Bulk Fill, X-tra Fill Vocco, Sonic Fill Kerr, Filtek Bulk Fill 3M, SDR Dentsply, EQUIA GC America INC), Bis-GMA, TEGDMA, Bis-EMA e HEMA aumenta com o tempo. No seu estudo a maior quantidade de concentrações de monómeros eluídos detectados foi vista como crítica em termos de reações tóxicas em células humanas.

Um estudo levado a cabo por Walters (2016) simulou a composição habitual das resinas compostas e revelou que o UDMA é mais citotóxico que o Bis-GMA, no entanto o Bis-GMA presente nos compósitos mostrou-se menos citocompatível que o UDMA. De todos os monómeros em estudo o TEGDMA foi caracterizado como o mais tóxico (Walters, Xia, Salih, Ashley, & Young, 2016).

A secção mais profunda de uma restauração é a que recebe menor intensidade de luz, pelo que sofre uma menor conversão dos seus monómeros. Uma vez que esta região é também a mais próxima do tecido pulpar, a citocompatibilidade das resinas *Bulk Fill* é de particular relevância (Walters et al., 2016).

Nalçaci, Oztan, & Yilmaz, (2004), afirmam que ao efectuar ensaios experimentais com diferentes métodos de polimerização de resinas compostas (Flowline[®] Heraeus, P60[®] 3M e Z250[®] 3M), não encontraram diferenças significativas de citotoxicidade. Um outro estudo feito com três resinas *Bulk Fill flow* mostra que

todas as resinas estudadas provocam baixos efeitos citotóxicos e estes não variam conforme o respectivo grau de conversão (Marigo et al., 2015). O que nos leva a crer que a citotoxicidade destas substâncias não está apenas relacionada com a conversão dos monómeros em polímeros.

Uma investigação feita com outras marcas de resinas compostas *Bulk fill* (SDR[®] e Venus[®] Bulk Fill) mostraram que as células de polpa dentária humana (de uma cultura primária) em contacto com essas resinas não alteraram o seu fenótipo, a sua viabilidade e não se verificaram casos de apoptose significativos (Rodríguez-Lozano et al., 2013), o que nos leva a sugerir que a nossa investigação poderia ser refeita usando outro tipo de células como por exemplo uma linha celular humana, de modo a verificar se os resultados se mantinham.

Segundo Cao (2005), diferentes testes de toxicidade apresentam diferentes resultados, de forma a evitar grandes discrepâncias deve-se utilizar sempre o mesmo tipo de células, ou seja a mesma linha celular. De qualquer maneira, não é possível uma extrapolação directa e simples de dados de culturas celulares para pacientes, pelo que os resultados dos ensaios de toxicidade sofrerão sempre diferenças quando aplicados *in vivo* (Cao et al., 2005).

Estudos de toxicologia molecular mostram que as substâncias libertadas por materiais restauradores dentários à base de resina são capazes de causar efeitos citotóxicos e genotóxicos relevantes na cavidade oral (Bakopoulou et al., 2009). Uma maior compreensão dos mecanismos celulares envolvidos nesses processos, bem como o esclarecimento sobre a indução de apoptose por monómeros, estimularão um debate construtivo sobre o desenvolvimento de materiais restauradores dentários (Krifka et al., 2013). Além disso, devem ser investigados em modelos animais o significado clínico dos dados de mutagénese e genotoxicidade *in vitro* bem como a possibilidade de efeitos mutagénicos sistémicos (Gallorini et al., 2014).

Os possíveis efeitos sistémicos provocados pelos materiais dentários podem levar anos ou mesmo décadas até manifestarem sinais clínicos. A abordagem científica realizável consiste em investigar *in vitro* se uma substância tem potencial para provocar lesões celulares e/ ou tecidulares (Schweikl et al., 2001).

Actualmente é muito difícil relacionar o aparecimento de uma doença sistémica com uma restauração a resina composta que o indivíduo possa ter num dente. Por este motivo, a comunidade científica tem a responsabilidade de estudar a toxicidade *in vitro*

e *in vivo* dos materiais restauradores actuais e a capacidade de originarem doenças sistémicas ou efeitos adversos locais crónicos ao longo do tempo, para garantir a biocompatibilidade dos materiais dentários (Geurtsen, 2003).

2. Genotoxicidade

Ao analisar as células expostas às soluções de resina, foi possível verificar que estas apresentavam uma morfologia muito diferente das células observadas no controlo positivo e no controlo negativo. Esta disparidade morfológica pode ser justificada pela elevada genotoxicidade das três resinas testadas.

A presença de micronúcleos indica o carácter genotóxico de uma substância, uma vez que reflecte a quebra das moléculas de DNA, que pode provocar a morte das células. Em todas as lâminas com células expostas aos extractos das resinas foram observadas várias fragmentações dos núcleos conclui-se portanto que o DNA destas células sofreu muitas fragmentações, tornando-as provavelmente inviáveis, e por isso estes extractos são considerados genotóxicos.

No caso de R3, a mais citotóxica das 3 resinas, foi verificado um decréscimo no número de células relativamente ao expectável, o que não deveria ter acontecido dado que utilizou-se a diluição que induz 50% de morte definida para cada uma das resinas. Isto pode dever-se ao facto da R3 ter uma elevada substantividade, ou seja, pode ter a capacidade de manter os seus efeitos, neste caso tóxicos, mesmo após a sua eliminação do meio envolvente e por isso ter uma expressão tóxica continuada.

Apesar de se ter iniciado o ensaio de genotoxicidade com a concentração de células definida através dos ensaios de citotoxicidade (a dose letal de cada um dos extratos de resina), a citotoxicidade entre os dois ensaios pode não ser exactamente a mesma. Isto porque o ensaio do MN dura mais 24h do que os dois ensaios de citotoxicidade aplicados. O que significa que ao contrário dos ensaios de citotoxicidade onde as células são analisadas horas depois de ser retirado o tóxico do seu meio envolvente, no ensaio de genotoxicidade acompanha-se a vida celular durante mais um dia, apesar de que nestas últimas 24h a mais as células já não estão expostas aos tóxicos.

Isto poderá querer dizer que após a exposição ao tóxico (ao qual as células estiveram expostas, em todos os ensaios, durante 24h) temos uma determinada percentagem de

viabilidade celular, no entanto passadas 24h após a remoção do tóxico algumas das células que estavam vivas no dia anterior perderam a sua viabilidade, sendo então a viabilidade celular diferente no momento zero após a remoção do tóxico e passadas 24h desse momento. Sendo esta a possível justificação para o facto de não terem sido contabilizadas as 1000 células binucleadas, expostas à resina R3, necessárias para a validação do ensaio do MN.

Interessa notar também que as células com fragmentação do conteúdo nuclear que foram tratadas com resina são morfologicamente diferentes das células com micronúcleos observadas nos controlos positivos tratadas com mitomicina c. O que nos leva a constatar que o poder genotóxico de todas as resinas é tão forte que as células não apresentam um ou dois micronúcleos independentes do núcleo principal, mas todo o seu núcleo se fragmenta em pequenos micronúcleos, inviabilizando assim a vida celular. Estas resinas provocam apenas a reacção genotóxica local, nas células que foram expostas à resina, não havendo proliferação das células afectadas.

A genotoxicidade dos monómeros das resinas compostas parece resultar de uma perturbação no equilíbrio redox das células, resultando consequentemente um aumento dos níveis de ROS e morte celular por apoptose (Schweikl et al., 2006).

Nos materiais resinosos, os monómeros de HEMA não polimerizados têm a capacidade de produzir ROS que por sua vez provocam a fragmentação do DNA, promovendo assim o aparecimento de micronúcleos em fibroblastos de ratinho, o que comprova a sua capacidade genotóxica (Lee et al., 2009; Luzhna, Kathiria, & Kovalchuk, 2013). Da mesma forma, já foi comprovada a genotoxicidade do TEGDMA *in vitro*, provocada em parte, também pelas ROS (Krifka et al., 2013; Schweikl et al., 2006).

No entanto, o mecanismo molecular pelo qual os monómeros de resina induzem genotoxicidade ainda não foi completamente elucidado. Um estudo levado a cabo por Gallorini (2013), afirma que apesar das altas concentrações de formação de micronúcleos induzidos pelo HEMA *in vitro*, *in vivo* não foram detectados aumentos de mutações genéticas. Isto comprova que os resultados obtidos *in vitro* são indicativos do que pode acontecer *in vivo*, mas os resultados nunca podem ser directamente extrapolados para as situações *in vivo*.

Posto isto, futuramente seria interessante realizar novamente os ensaios de citotoxicidade fazendo uma pequena alteração no seu protocolo, acrescentando 24h entre a remoção da solução das resinas do meio celular e a aplicação da solução do MTT ou do Cristal Violeta, de maneira a verificar se a dose letal média para cada uma das resinas se mantinha passadas as 24h ou se aumentava mesmo após a remoção do estímulo. Justificando-se desta forma a diminuição do número de células nos ensaios de R3 e indicando a alteração do metabolismo celular.

VII. CONCLUSÃO

Através dos ensaios de citotoxicidade (MTT e Cristal Violeta), foi definida a dose letal para cada uma das resinas. Por ordem decrescente, em ambos os ensaios, verificou-se uma maior citotoxicidade em R3 - Coltene Fill-Up!TM > R1 - Tetric EvoCeram[®] Bulk Fill > R2 - FiltekTM Bulk Fill. Curiosamente, por esta mesma ordem mas de forma crescente têm-se os tempos de polimerização e a consistência de cada uma destas resinas após a fotopolimerização. O que nos leva a dizer que a resina FiltekTM Bulk Fill, quando comparada com as outras resinas testadas neste estudo, possivelmente devido ao seu maior tempo de polimerização e à sua consistência menos fluida após a polimerização, foi a que teve um maior grau de conversão dos seus monómeros e por conseguinte foi a que causou menores efeitos citotóxicos.

Por outro lado, R3 é claramente a resina mais citotóxica, possivelmente devido à libertação dos seus monómeros de TEGDMA, que já foram identificados, noutros estudos, como um dos monómeros mais citotóxicos presentes nas resinas compostas.

Com estes resultados podemos ditar qual a mais citotóxica, mas interessa também saber quais os monómeros que não foram convertidos em polímeros e quantificar cada um deles, de forma a averiguar se diferentes quantidades e tipos de monómeros causam diferentes graus de toxicidade.

Relativamente à análise da genotoxicidade destas resinas, podemos dizer que todas elas causam alterações genéticas nos fibroblastos de ratinho 3T3, pois todas as células expostas às concentrações relativas dos eluídos de resina apresentavam alterações morfológicas do núcleo.

Em R3, devido à alta citotoxicidade da resina, não se conseguiu contar o número mínimo de células por ensaio (1000 células). Sendo por este motivo sugerido repetir novamente os ensaios de citotoxicidade mas desta vez avaliando a DL₅₀ 24h após a remoção do tóxico, de forma a assegurar uma contagem final de 1000 células para todas as resinas e fazer uma melhor análise do efeito genotóxico entre as resinas estudadas.

Uma vez que através do ensaio genotóxico efectuado neste estudo não foi conclusivo, sugere-se a realização de outro ensaio da genotoxicidade como é o caso do

Ensaio do Túnel, Ensaio do Cometa e Ensaio das cromátides irmãs, de forma a ser possível verificar e validar o potencial genotóxico destas resinas.

Através da análise dos resultados obtidos, aceita-se a hipótese experimental 3, uma vez que se verificaram diferenças na percentagem de viabilidade celular e alterações morfológicas dos núcleos celulares dos fibroblastos gengivais de ratinho quando em contacto com os extractos das resinas compostas Filtek™ Bulk Fill, Tetric EvoCeram® Bulk Fill e Coltene Fill-Up!™.

Futuramente seria interessante desenhar um novo estudo que questione os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos das resinas compostas *Bulk Fill*, efectuando ensaios *in vitro* com células humanas da cavidade oral.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aalto-Korte K Alanko K, K. O. J. R., Aalto-Korte, K., Alanko, K., Kuuliala, O., & Jolanki, R. (2007). Methacrylate and acrylate allergy in dental personnel. *Contact Dermatitis*, 57(5), 324–330. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01237.x>
- Almutary, A., & Sanderson, B. J. S. (2016). The MTT and Crystal Violet Assays : Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing, 35(4), 454–462. <http://doi.org/10.1177/1091581816648906>
- Alshali, R. Z., Salim, N. A., Sung, R., Satterthwaite, J. D., & Silikas, N. (2015). Qualitative and quantitative characterization of monomers of uncured bulk-fill and conventional resin-composites using liquid chromatography/mass spectrometry. *Dental Materials*, 31(6), 711–720. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.03.010>
- Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y., Tonosaki, K., & Fujisawa, S. (2004). Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. *Journal of Oral Rehabilitation*, 31(12), 1155–1164. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01357.x>
- Bakopoulou, A., Mourelatos, D., Tsiftoglou, S., Giassin, N., Mioglou, E., & Garefis, P. (2009). Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 672(2), 103–12. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.011>
- Bakopoulou, A., Papadopoulos, T., & Garefis, P. (2009). Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3861–3899. <http://doi.org/10.3390/ijms10093861>
- Bakopoulou, A., Triviai, I., Tsiftoglou, A., & Garefis, P. (2006). In vitro assessment of cytotoxicity of resin-based dental restorative materials on WEHI 13 var fibroblasts. *The International Journal of Prosthodontics*, 19(1), 13–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479751>
- Bandarra, S., Fernandes, A. S., Magro, I., Guerreiro, P. S., Pingarilho, M., Churchwell, M. I., ... Oliveira, N. G. (2013). Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells. *Mutagenesis*, 28(6), 721–9. <http://doi.org/10.1093/mutage/get052>
- Bando, K., Takahashi, H., Kinbara, M., Tanaka, Y., Kuroishi, T., Sasaki, K., ... Endo, Y. (2014). Resin Monomers Act as Adjuvants in Ni-induced Allergic Dermatitis in vivo. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1101–1107. <http://doi.org/10.1177/0022034514552674>
- Bonassi, S., Biasotti, B., Kirsch-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Burgaz, S., ... Fenech, M. (2009). State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative. *Mutagenesis*, 24(4), 295–302. <http://doi.org/10.1093/mutage/gep019>
- Cao, T., Saw, T. Y., Heng, B. C., Liu, H., Yap, A. U. J., & Ng, M. L. (2005). Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology*, 25(2), 101–108. <http://doi.org/10.1002/jat.1041>

- Carrard, V. C., Costa, C. H., Ferreira, L. A., & Lauxen, I. S. (2007). Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. *Micronucleus Assay – A Biomarker Of Genotoxic Damage In Exfoliated Oral Mucosa Cells. Revista Da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, 48(1/3), 77–81.
- Castro-garza, J., Barrios-garcía, H. B., Cruz-vega, D. E., Carranza-rosales, P., Said-fernán, S., Molina-torres, C. A., ... Castro-garza, J. (2017). Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of Mycobacterium tuberculosis strains, (2007), 733–737. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.46915-0>
- Cebe, M. A., Cebe, F., Cengiz, M. F., Cetin, A. R., 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>
- Chiba, K., Kawakami, K., & Tohyama, K. (1998). Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12(3), 251–258. [http://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00107-0](http://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00107-0)
- Chun, J. S., Har, A., Lim, H., & Lim, H. (2016). The analysis of cost-effectiveness of implant and conventional fixed dental prosthesis, 53–61.
- Durner, J., Walther, U. I., Zaspel, J., Hickel, R., & Reichl, F.-X. (2010). Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells. *Biomaterials*, 31(5), 818–23. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.097>
- Ergun, G., Egilmez, F., & Cekic-Nagas, I. (2011). The cytotoxicity of resin composites cured with three light curing units at different curing distances. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 16(2). <http://doi.org/10.4317/medoral.16.e252>
- Ersev, H., Schmalz, G., Bayirli, G., & Schweikl, H. (1999). Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. *Journal of Endodontics*, 25(5), 359–63. [http://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81172-6](http://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81172-6)
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81–95.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., & Bonassi, S. (1999). The Human MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428(1–2), 271–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10517999>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Flores, M., & Yamaguchi, M. U. (2008). Teste do Micronúcleo: Uma Triagem Para Avaliação Genotóxica. *Revista Saúde E Pesquisa*, 1(3), 337–340.
- Gallorini, M., Cataldi, A., & di Giacomo, V. (2014). HEMA-induced cytotoxicity: Oxidative stress, genotoxicity and apoptosis. *International Endodontic Journal*, 47(9), 813–818. <http://doi.org/10.1111/iej.12232>
- Geurtsen, W. (2003). Toxicology of Dental Materials and “Clinical Experience.” *Journal of Dental Research*, 82(7), 500–500. <http://doi.org/10.1177/154405910308200701>
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, C. R. (1990). Cytotoxic effect of resin components on cultured mammalian fibroblast. *J.Dent.Res*, 70, 1450–1455.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., &

- Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, 659(1–2), 93–108. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- Ilie, N., & Stark, K. (2014). Curing behaviour of high-viscosity bulk-fill composites. *Journal of Dentistry*, 42(8), 977–985. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.05.012>
- Inamitsu, H., Okamoto, K., Sakai, E., Nishishita, K., Murata, H., & Tsukuba, T. (2017). The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity. *Journal of Applied Toxicology*, 37(7), 817–824. <http://doi.org/10.1002/jat.3429>
- Jandt, K. D., & Sigusch, B. W. (2009). Future perspectives of resin-based dental materials. *Dental Materials*, 25(8), 1001–1006. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.02.009>
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., Aardema, M. J., & Fenech, M. (2011). In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, 26(1), 177–84. <http://doi.org/10.1093/mutage/geq068>
- Krifka, S., Spagnuolo, G., Schmalz, G., & Schweikl, H. (2013). A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34(19), 4555–4563. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.019>
- Kwon, J. H., Park, H. C., Zhu, T., & Yang, H.-C. (2015). Inhibition of odontogenic differentiation of human dental pulp cells by dental resin monomers. *Biomaterials Research*, 19, 8. <http://doi.org/10.1186/s40824-015-0030-6>
- Lim, S., Yap, A., Loo, C., Ng, J., Goh, C., Hong, C., & Toh, W. (2016). Comparison of cytotoxicity test models for evaluating resin-based composites. *Human & Experimental Toxicology*. <http://doi.org/10.1177/0960327116650007>
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond, 4(July), 1–17. <http://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>
- Mahasti, S., Sattari, M., Romoozi, E., & Akbar-Zadeh Baghban, A. (2011). Cytotoxicity Comparison of Harvard Zinc Phosphate Cement Versus Panavia F2 and Rely X Plus Resin Cements on Rat L929-fibroblasts. *Cell Journal*, 13(3), 163–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Marigo, L., Spagnuolo, G., Malara, F., Martorana, G. E., Cordaro, M., Lupi, A., & Nocca, G. (2015). Relation between conversion degree and cytotoxicity of a flowable bulk-fill and three conventional flowable resin-composites. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(23), 4469–4480.
- Mjör, I. (1990). Current views on biological testing of restorative materials. *Journal of Oral Rehabilitation*, 17(6), 503–507. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1990.tb01421.x>
- Müller, B. P., Eisenträger, a, Jannen-Dechent, W., Dott, W., & Hollender, J. (2003). Effect of sample preparation on the in vitro genotoxicity of a light curable glass ionomer cement. *Biomaterials*, 24(4), 611–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12437955>
- Nagocka, R., Jakubowska, K., Chlubek, D., & Buczkowska-Radliska, J. (2015). Elution study of unreacted TEGDMA from bulk-fill composite (SDR Dentsply) using HPLC. *Advances*

- in *Medical Sciences*, 60(2), 191–198. <http://doi.org/10.1016/j.advms.2015.02.003>
- Nalçacı, A., Oztan, M. D., & Yilmaz, S. (2004). Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. *International Endodontic Journal*, 37(2), 151–156. <http://doi.org/10.1111/j.0143-2885.2004.00779.x>
- OCDE. (2010). OECD guideline for the testing of chemicals 487, (July).
- Ratanasathien, S., Wataha, J. C., Hanks, C. T., & Dennison, J. B. (1995). Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 74(9), 1602–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7560423>
- 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>
- Rothmund, L., Reichl, F. X., Hickel, R., Styllou, P., Styllou, M., Kehe, K., ... Hgg, C. (2017). Effect of layer thickness on the elution of bulk-fill composite components. *Dental Materials*, 33(1), 54–62. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2016.10.006>
- 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: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 23(1), 34–9. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.11.037>
- Schmalz, G. (2002). Materials Science: Biological Aspects. *Journal of Dental Research*, 81(10), 660–663. <http://doi.org/10.1177/154405910208101001>
- Schweikl, H., Schmalz, G., & Spruss, T. (2001). The Induction of Micronuclei in vitro by Unpolymerized Resin Monomers. *Journal of Dental Research*, 80(7), 1615–1620. <http://doi.org/10.1177/00220345010800070401>
- Schweikl, H., Spagnuolo, G., & Schmalz, G. (2006). Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers. *Journal of Dental Research*, 85(10), 870–877. <http://doi.org/10.1177/154405910608501001>
- Shehata, M., Durner, J., Eldenez, A., Van Landuyt, K., Styllou, P., Rothmund, L., ... Reichl, F. X. (2013). Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 29(9), 971–979. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.007>
- Stea, S., Visentin, M., Cervellati, M., Verri, E., Cenni, E., Savarino, L., & Pizzoferrato, a. (1998). In vitro sister chromatid exchange induced by glass ionomer cements. *Journal of Biomedical Materials Research*, 40(4), 545–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9599030>
- Table_of_Contents. (2013). In *ATCC® PRIMARY CELL Culture Guide tips and techniques for culturing primary cells* (Vol. 15, p. NP). <http://doi.org/10.1093/ntr/nts294>
- Toh, W., Yap, A., & Lim, S. (2015). In Vitro Biocompatibility of Contemporary Bulk-fill Composites. *Operative Dentistry*, 273, 150803124844003. <http://doi.org/10.2341/15-059-L>
- Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., & Reichl, F. X. (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on

- human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 26(1), 51–58. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2009.08.007>
- van Dijken, J. W. V., & Pallesen, U. (2016). Posterior bulk-filled resin composite restorations: A 5-year randomized controlled clinical study. *Journal of Dentistry*, 51, 29–35. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.05.008>
- Walters, N. J., Xia, W., Salih, V., Ashley, P. F., & Young, A. M. (2016). Poly(propylene glycol) and urethane dimethacrylates improve conversion of dental composites and reveal complexity of cytocompatibility testing. *Dental Materials*, 32(2), 264–277. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.017>
- Wataha, J. C., Rueggeberg, F. a, Lapp, C. a, Lewis, J. B., Lockwood, P. E., Ergle, J. W., & Mettenburg, D. J. (1999). In vitro cytotoxicity of resin-containing restorative materials after aging in artificial saliva. *Clinical Oral Investigations*, 3(3), 144–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10803126>
- Zorzin, J., Maier, E., Harre, S., Fey, T., Belli, R., Lohbauer, U., ... Taschner, M. (2015). Bulk-fill resin composites: Polymerization properties and extended light curing. *Dental Materials*, 31(3), 293–301. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2014.12.010>

IX. ANEXOS

MTT

Tabelas de valores de absorvância obtidos no ensaio do MTT

		R1 - Tetric EvoCeram Bulk Fill							
		75%	60%	50%	20%	10%	5%	1%	0,50%
		0,527	0,567	0,59	0,643	0,693	0,725		
		0,522	0,583	0,583	0,633	0,688	0,71		
		0,538	0,573	0,601	0,639	0,671	0,733		
		0,529	0,598	0,591	0,66	0,7	0,698		
		0,521	0,56	0,596	0,619	0,703	0,691		
		0,533	0,581	0,588	0,68	0,684	0,703		
		0,561	0,576	0,612	0,677	0,655	0,719		
		0,546	0,641	0,606	0,698	0,697	0,722		
		0,519	0,533	0,614	0,657	0,681	0,691		
		0,52	0,519	0,59	0,644	0,676	0,733		
		0,542	0,569	0,577	0,671	0,699	0,715		
		0,533	0,577	0,631	0,656	0,682	0,726		
		0,517	0,537	0,623	0,651	0,701	0,688		
		0,566	0,592		0,673	0,689	0,724		
		0,522				0,69			
		0,532							
		0,564		0,623	0,67	0,7	0,78	0,814	0,812
		0,61		0,632	0,679	0,688	0,658	0,722	0,875
		0,646		0,601	0,637	0,67	0,739	0,738	0,87
		0,554		0,564	0,668	0,744	0,78		0,887
		0,502		0,591	0,719	0,681	0,707	0,778	0,767
				0,685	0,713	0,711	0,705	0,801	0,775
				0,588		0,646	0,669	0,71	
								0,757	
		0,646		0,558	0,64	0,593	0,73	0,822	0,868
		0,633		0,546	0,67	0,692	0,764	0,734	0,87
		0,582		0,565	0,664	0,655	0,703	0,716	0,77
		0,505		0,662	0,679	0,671	0,715	0,794	0,881
		0,534		0,65	0,562	0,72		0,735	0,87
				0,577	0,559	0,731	0,659	0,778	0,734
				0,616		0,689	0,722	0,811	0,865
Média	0,5502	0,57186	0,60222	0,65619	0,68621	0,71515	0,765	0,83415	
Desvio Padrão	0,0413	0,03015	0,03182	0,03665	0,02774	0,0303	0,03939	0,0542	
Média Final	0,5015	0,52323	0,5536	0,60757	0,63758	0,66652	0,71638	0,78553	
Total %Redução de MTT/viabilidade	45,985	47,9747	50,7589	55,7073	58,4593	61,1129	65,6838	72,0245	

R2 - Filtek Bulk Fill							
75%	60%	50%	20%	10%	5%	1%	
0,486	0,603	0,696	0,744	0,744	0,801		
0,464	0,598	0,701	0,7	0,751	0,773		
0,482	0,59	0,7	0,701	0,743	0,781		
0,451	0,586	0,722	0,738	0,726	0,743		
0,475	0,612	0,709	0,741	0,76	0,723		
0,48	0,609	0,716	0,713	0,711	0,776		
0,492	0,602	0,688	0,733	0,731	0,761		
0,455	0,613	0,693	0,721	0,725	0,78		
0,447	0,588	0,704	0,706	0,718	0,739		
0,492	0,595	0,663	0,711	0,763	0,755		
0,488	0,61	0,731	0,695	0,714	0,763		
0,475	0,633	0,721	0,724	0,728	0,791		
0,491	0,597	0,711		0,752	0,722		
0,486	0,621	0,732	0,726		0,747		
0,477	0,579		0,735				
			0,722				
		0,669	0,666		0,695	0,906	
		0,793	0,743	0,673	0,707	0,883	
		0,617	0,692	0,679	0,884	0,883	
				0,814	0,765	0,906	
		0,758	0,784	0,681		0,759	
		0,744	0,743	0,722	0,773	0,814	
		0,664	0,771	0,76	0,772	0,893	
		0,762	0,743	0,812	0,787	0,849	
		0,683	0,7	0,688	0,812	0,899	
		0,69		0,739	0,803	0,871	
		0,661	0,689	0,771	0,775	0,867	
		0,725	0,701	0,716	0,699	0,833	
		0,741	0,742	0,722	0,733	0,891	
		0,77	0,698	0,759	0,711	0,84	
		0,656	0,711	0,788	0,727	0,798	
			0,766			0,885	
Média	0,47607	0,6024	0,70786	0,72272	0,7367	0,76064	0,86106
Desvio Padrão	0,01509	0,01432	0,03908	0,02683	0,0361	0,04029	0,04246
Média Final	0,42744	0,55378	0,65923	0,6741	0,688	0,71202	0,81244
Total	39,1918	50,7752	60,4444	61,8076	63,086	65,2843	74,4917

R3 - Coltene Fill Up!							Controlo negativo	DMSO		
75%	50%	20%	10%	5%	1%	0,50%				
							1,13	0,046		
							1,128	0,045		
							1,134	0,046		
							1,141	0,046		
							1,128	0,045		
							1,133	0,047		
0,459	0,5	0,539	0,622	0,702	0,894	0,858	1,002	0,046		
0,457	0,539	0,577	0,675	0,721	0,765	0,793	0,986	0,046		
0,45	0,507	0,647	0,71	0,666	0,824	0,825	1,104	0,056		
0,322	0,556	0,649	0,633	0,617	0,795	0,794	1,211	0,055		
0,468	0,652	0,653	0,651	0,667	0,708	0,728	0,925	0,05		
0,411	0,522	0,566	0,722	0,716	0,879	0,817	0,947	0,048		
		0,653		0,768		0,821	0,958	0,047		
		0,644					0,985	0,041		
0,4	0,566		0,712	0,672	0,834	0,821	1,365	0,047		
0,472	0,62		0,693	0,756	0,754	0,882	1,258	0,051		
0,401		0,509	0,748	0,729	0,762	0,815	1,242	0,06		
0,444	0,605	0,686	0,66	0,727	0,823	0,743	1,261	0,056		
0,486	0,618	0,508	0,651	0,763	0,741	0,791		0,045		
0,45	0,575	0,533	0,627	0,748	0,748	0,712	1,322	0,048		
	0,627	0,672	0,665	0,76	0,826		1,197	0,041		
	0,652	0,585		0,752			1,326	0,041		
0,435	0,5799	0,6015	0,67454	0,7176	0,79638	0,8	1,139266667	0,04863		
0,0451	0,0531	0,06299	0,03959	0,04463	0,05575	0,04869	0,158175972	0,00574		
0,38638	0,5313	0,55288	0,62591	0,66898	0,74776	0,75138	1,090641667			
Total	%Redução de MTT/viabilidade	35,4264	48,714	50,6926	57,3895	61,3377	68,5614	68,8929	100	0

Testes de Normalidade Ensaio do MTT

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
R1_75	,268	7	,138	,827	7	,075
R1_60	,209	7	,200*	,927	7	,523
R1_50	,262	7	,157	,873	7	,199
R1_20	,180	7	,200*	,925	7	,509
R1_10	,218	7	,200*	,947	7	,702
R1_5	,178	7	,200*	,947	7	,707
R1_1	,209	7	,200*	,938	7	,621
R1_05	,352	7	,009	,796	7	,037
R2_75	,194	7	,200*	,936	7	,605
R2_60	,214	7	,200*	,900	7	,331
R2_50	,226	7	,200*	,903	7	,350
R2_20	,167	7	,200*	,918	7	,457
R2_10	,188	7	,200*	,955	7	,775
R2_5	,170	7	,200*	,980	7	,960
R2_1	,313	7	,037	,833	7	,085
R3_75	,290	7	,077	,792	7	,034
R3_50	,174	7	,200*	,916	7	,437
R3_20	,264	7	,150	,834	7	,088
R3_10	,238	7	,200*	,844	7	,108
R3_5	,173	7	,200*	,940	7	,636
R3_1	,146	7	,200*	,954	7	,762
R3_05	,227	7	,200*	,876	7	,210

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Comparações por Método Pairwise Ensaio do MTT

Variável dependente: Viabilidade Celular

(I) Resina	(J) Resina	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig. ^d	95% Intervalo de Confiança para Diferença ^d	
					Limite inferior	Limite superior
R1	R2	-,023 ^{*,b}	,004	,000	-,031	-,015
	R3	,012 ^{*,b}	,005	,015	,002	,021
R2	R1	,023 ^{*,c}	,004	,000	,015	,031
	R3	,035 ^{*,b,c}	,005	,000	,025	,044
R3	R1	-,012 ^{*,c}	,005	,015	-,021	-,002
	R2	-,035 ^{*,b,c}	,005	,000	-,044	-,025

CRISTAL VIOLETA

Tabelas de valores de absorvância obtidos no ensaio do CV

		R1 - Tetric EvoCeram Bulk Fill						
		75%	60%	50%	20%	10%	5%	1%
			1,206	1,344				
		1,09	1,233	1,349	1,577		1,89	
		1,208	1,241	1,357	1,7	1,906	2,001	
		1,126	1,2	1,288	1,563	1,799	1,935	
		1,133	1,211	1,31	1,579	1,892	1,988	
		1,149	1,206	1,346	1,683	1,845	1,973	
		1,165	1,318	1,299	1,703	1,873	1,965	
		1,147	1,277	1,289	1,699	1,736	1,993	
		1,164	1,286	1,329	1,568	1,901	1,965	
		1,109	1,333	1,356	1,507	1,89	1,988	
		1,166	1,304	1,301	1,698	1,873	1,975	
		1,121	1,159	1,322	1,559	1,891	2,006	
		1,103	1,281	1,389	1,701	1,877	1,997	
		1,193	1,226		1,662	1,789	1,981	
1				1,253	1,528	1,452	1,844	2,22
2					1,382	1,751	1,811	2,161
3				1,597	1,764	1,908	2,192	2,302
4				1,256	1,639	1,832	2,338	2,099
5				1,166	1,436	1,966	2,331	2,234
6					1,68	2,086	2,27	2,31
7					1,797	2,148	2,043	2,211
8				1,111	1,964	1,728	2,224	
1				1,427	1,218		1,96	2,042
2				1,518	1,441	1,723	1,716	2,034
3				1,257	1,553	2,024	1,957	2,014
4				1,514	1,67	1,647	2,336	2,503
5				1,369	1,513	1,946	2,271	2,166
6				1,793	1,77	1,904	2,27	
7					1,681	2,129	2,463	2,167
8					1,657	1,871	2,3	2,199
	Média	1,14415385	1,2486	1,35583	1,61697	1,86619	2,06838	2,19014
	Desvio Padrão	0,1105622	0,1747	0,21946	0,29463	0,36289	0,41175	0,57643
	Média Final	1,09501099	1,1995	1,30669	1,56782	1,81704	2,01924	2,141
Total	%Redução	42,6453595	46,715	50,8892	61,0591	70,765	78,6395	83,3816

R2 - Filtek Bulk Fill							
75%	60%	50%	20%	10%	5%	1%	
1,427	1,621	1,631	1,788	1,893	2,003		
1,445	1,427	1,623	1,793	1,99	2,011		
	1,499	1,641	1,802	1,906	2,009		
1,284	1,537	1,634	1,833	1,886	2,002		
1,233	1,553	1,619	1,805	1,945	2,026		
1,287	1,52	1,638	1,798	1,983	1,993		
1,225	1,499	1,631	1,834	1,933	1,986		
1,34	1,561	1,599	1,756	1,877	2,015		
1,352	1,528	1,601	1,776	1,958	2,042		
1,296	1,522	1,638	1,802	1,974	2,031		
1,201	1,506	1,62	1,825	1,996	1,986		
1,332	1,553	1,633	1,737	1,959	1,992		
1,329	1,498	1,629	1,752	1,865	1,973		
1,299	1,505	1,655	1,746	1,802			
			1,777	1,876	1,988	1,986	
		1,743	1,858	1,809	1,999	2,285	
		1,677	1,656	1,92	2,02	2,041	
		1,605	1,894	2,295	2,285	2,408	
		1,522	2,192	2,206	2,38	2,385	
		1,691	1,92	1,992	2,2	2,274	
		1,74	1,67	2,03	1,958	2,048	
			1,671	2,011	2,083	2,439	
		1,575	1,96	2,191	2,15	2,337	
		1,593	1,902	2,186		2,225	
		1,567	1,872	1,929	2,43	2,465	
		1,771	2,005	1,292	2,101	1,899	
		1,606	1,931	2,263	2,5	1,92	
		1,555	1,802	1,96	2,003	1,951	
		1,463	1,758	1,855	1,958	2,067	
			1,688	2,032	2,1	2,211	
Média	1,31154	1,5235	1,62593	1,8201	1,96047	2,07943	2,1838
Desvio Padrão	0,16519	0,24212	0,22198	0,31051	0,3777	0,40352	0,5603
Média Final	1,2624	1,47436	1,57678	1,77096	1,91132	2,03029	2,1347
Total %Redução de CV	49,1642	57,419	61,408	68,9702	74,4368	79,0698	83,135

R3 - Coltene Fill Up!							Controlo	Branco
50%	20%	10%	5%	1%				
						2,603	0,047	
						2,51	0,046	
						2,384	0,05	
						2,386	0,053	
						2,569	0,046	
						2,359	0,048	
						2,166		
1,301	1,44		1,526	1,603		2,519	0,047	
1,22	1,388	1,33	1,488	1,669		2,567	0,062	
1,323	1,336	1,445	1,656	1,533		2,431	0,063	
1,12	1,202	1,407	1,622	1,688		2,388	0,059	
1,273	1,301	1,323	1,597	1,548		2,575	0,039	
	1,226	1,351	1,563	1,563		2,744	0,036	
1,119		1,288				2,81	0,041	
			1,606				0,046	
	1,028		1,676	1,836		2,65		
1,018	1,26	1,676	1,528	1,741		2,539		
	1,208	1,809	1,185	1,877		2,533	0,049	
1,062	1,24	1,562	1,549	1,775		2,498	0,054	
1,447	1,278	1,473	1,7	1,699		2,456	0,044	
1,299	1,099	1,683	1,479	1,78		2,512	0,041	
1,473	1,664	1,675	1,668			2,726	0,047	
	1,52	1,515					0,06	
Média	1,24136	1,29929	1,50285	1,5602	1,69267	2,56771	0,04914	
Desvio Padrão	0,14923	0,16482	0,16691	0,1289	0,11408	0,12325	0,00899	
Média Final	1,19222	1,25014	1,4537	1,5111	1,64352	2,56771		
Total %Redução de CV	46,4312	48,687	56,6147	58,849	64,0073	100	0	

Testes de Normalidade Ensaio do CV

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
R1_75	,153	11	,200 [*]	,975	11	,929
R1_60	,182	11	,200 [*]	,895	11	,161
R1_50	,218	11	,152	,872	11	,083
R1_20	,261	11	,035	,819	11	,017
R1_10	,311	11	,004	,774	11	,004
R1_5	,249	11	,055	,854	11	,048
R1_1	,123	11	,200 [*]	,934	11	,457
R2_75	,122	11	,200 [*]	,950	11	,642
R2_60	,203	11	,200 [*]	,940	11	,522
R2_50	,207	11	,200 [*]	,881	11	,107
R2_20	,162	11	,200 [*]	,950	11	,646
R2_10	,145	11	,200 [*]	,916	11	,289
R2_5	,107	11	,200 [*]	,956	11	,722
R2_1	,170	11	,200 [*]	,901	11	,189
R3_50	,156	11	,200 [*]	,950	11	,645
R3_20	,192	11	,200 [*]	,951	11	,656
R3_10	,166	11	,200 [*]	,911	11	,253
R3_5	,261	11	,035	,766	11	,003
R3_1	,125	11	,200 [*]	,950	11	,643

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Comparações por Método Pairwise Ensaio do CV

Variável dependente: Viabilidade Celular

(I) Resina	(J) Resina	Diferença média (I-J)	Erro Erro	Sig. ^d	95% Intervalo de Confiança para Diferença ^d	
					Limite inferior	Limite superior
R1	R2	-,145 [*]	,017	,000	-,178	-,112
	R3	,182 ^{*b}	,021	,000	,141	,224
R2	R1	,145 [*]	,017	,000	,112	,178
	R3	,327 ^{*b}	,021	,000	,286	,368
R3	R1	-,182 ^{*c}	,021	,000	-,224	-,141
	R2	-,327 ^{*c}	,021	,000	-,368	-,286

Baseado em médias marginais estimadas

*. A diferença média é significativa no nível ,05.

b. Uma estimativa da média marginal da população modificada (J).

c. Uma estimativa da média marginal da população modificada (I).

d. Ajustamento para diversas comparações: Diferença Menos Significativa (equivalente a nenhum ajustamento).

