

ANDRESSA FABRO LUCIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DOS SISTEMAS
ADESIVOS UNIVERSAIS**

BRASÍLIA

2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANDRESSA FABRO LUCIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DOS SISTEMAS
ADESIVOS UNIVERSAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro

BRASÍLIA

2014

ANDRESSA FABRO LUCIANO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DOS SISTEMAS
ADESIVOS UNIVERSAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 21 de agosto de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia (Presidente)
Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
Universidade de Brasília - UnB

Dedico este trabalho aos meus professores, pelas valiosas lições recebidas, aos amigos, pelas contribuições e horas despendidas e, principalmente, aos meus familiares por todo apoio oferecido para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** pela força, coragem e fé;

Ao meu pai **Paulo César Luciano** e principalmente a minha mãe **Angela Maria Fabro Luciano** pelo sólido exemplo, formação moral, paciência, amor e companheirismo durante esta longa e árdua conquista. Mãe, nunca esquecerei o que fizeste por mim!

Ao meu marido **Alzeir Costa dos Santos** pelo carinho, zelo, apoio, compreensão e incentivo, que refletiram na tranquilidade para que pudesse alcançar o meu objetivo.

À minha irmã **Juliana Fabro Luciano** pela amizade e exemplo de superação.

Às minhas professoras **Fernanda Cristina Pimentel Garcia e Ana Paula Dias Ribeiro, orientadora e co-orientadora**, que, pacientemente, indicaram com precisão os caminhos a serem trilhados. Nesses anos de convivência aprendi a admirá-las cada vez mais, seja pela capacidade intelectual ou pelo entusiasmo de ensinar e pesquisar. Muito obrigada, primeiramente pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação e excelente orientação, além da amizade e principalmente pela confiança depositada!

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Brasília**, na pessoa do Reitor, **Prof. Dr. Ivan Marques de Toledo Camargo**.

À **Faculdade de Ciências da Saúde**, na pessoa da Diretora, **Profa. Dra. Maria Fátima Sousa**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**, na pessoa do Coordenador, **Prof. Dr. Francisco de Assis Neves**, aos **professores e funcionários**.

Ao **Decanato de Pesquisa e Pós-graduação (DPP)** pelo auxílio concedido para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Odontologia de Araraquara**, representada pelo **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por permitir a utilização das dependências do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, por me receber com muita atenção e cuidado e permitir que eu conseguisse realizar grande parte desse experimento. Ao senhor os meus profundos e sinceros agradecimentos.

Às professoras, **Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra e Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo** por disponibilizarem a infraestrutura do **Laboratório de Histopatologia Bucal** para a realização da parte experimental desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Leandro Augusto Hilgert**, Professor da Área de Dentística do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde, da UnB, pela orientação da análise estatística dos dados e pela contribuição científica desta pesquisa.

À **Acecil – Central de Esterelização Comércio e Indústria Ltda**, responsável pela esterilização a óxido de etileno, na qual foram realizadas para dar início a este trabalho.

À professora da Área de Dentística do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde, **Profa. Dra. Patrícia Nobrega R. Pereira** pelo exemplo de profissionalismo, conhecimentos compartilhados e apoio dispendido.

À **Diana Soares e Fernanda Basso** pela ajuda inestimável durante todas as etapas dessa pesquisa. O meu muito obrigada pela atenção e disposição para me ajudar sempre que precisei.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Mede-se a grandeza de uma idéia pela resistência que ela provoca.
(Anaxágoras)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos universais sobre cultura primária de células pulpares. Setenta discos de dentina foram obtidos de dentes terceiros molares humanos íntegros e divididos em sete grupos considerando sua condutância hidráulica. Os discos foram montados em câmaras pulpares artificiais e sob sua superfície pulpar, foram cultivadas células por 48 horas. Os grupos foram definidos da seguinte forma: G1 - controle (PBS), G2 – convencional de 3 passos (Adper™ Scotchbond™ Multi-purpose); G3 – autocondicionante de passo único (Clearfil™ SE³ Bond); G4 e G5 - autocondicionante de passo único e convencional de 2 passos, respectivamente (Scotchbond™ Universal); G6 e G7 – autocondicionante e convencional de 2 passos, respectivamente (Peak® Universal Bond). Decorridos 24 horas, foram avaliados o metabolismo celular pelo teste do MTT e a morfologia pela MEV. O meio de cultura em contato com as células foi coletado e utilizado para análise de morte celular utilizando o sistema de imagem celular GE InCell Analyzer 2000. Os dados foram avaliados pelos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis seguido do teste comparativo de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Todos os sistemas adesivos testados reduziram a porcentagem do metabolismo celular, comparados com o grupo controle. Os mais citotóxicos foram os grupos G5 e G2. Os grupos G2, G3, G4, G5, G6 e G7 reduziram o metabolismo em 33,7%, 19,2%, 16,83%, 42,27%, 28,83% e 8,86%, respectivamente. O potencial citotóxico dos adesivos foi $G5 > G2 > G6 > G3 > G4 > G7$. O G6 produziu o efeito mais fraco de indução de morte por apoptose nas células da polpa, por outro lado, os grupos G2 e G7 resultaram nos maiores valores (16,58% e 15,03%), respectivamente. A maior porcentagem de necrose foi induzida pelo grupo G2 (63,44%), sendo esta estatisticamente diferente de todos os grupos, exceto para o G4. Morte celular por necrose foi o tipo mais prevalente induzida pelos adesivos estudados. Todos os sistemas adesivos testados causaram morte (apoptose e necrose), lesão celular e alterações de morfologia, o que indica potencial citotóxico para as células pulpares.

Palavras-chave: Citotoxicidade, cultura de células, adesivos dentinários.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the transdentinal cytotoxicity of universal adhesive systems using pulp cells culture. Seventy dentin disks were obtained from intact human third molars and divided into seven groups considering their hydraulic conductance. The disks were adapted on artificial pulp chamber and cells were seeded over their pulpal surface. After 48 hours, the chambers were inverted and the adhesive procedures were performed according to the groups: G1 - control (PBS), G2 – etch-and-rinse 3 step (Adper™ Scotchbond™ Multi-purpose); G3 – self-etch single step (Clearfil™ SE3 Bond); G4 and G5 – etch-and-rinse single step and self-etch 2 steps, respectively (Scotchbond™ Universal); G6 and G7 – etch-and-rinse and self-etch 2 steps, respectively (Peak Universal Bond®). After 24 hours, cell metabolism was evaluated by MTT assay and morphology by SEM. The culture medium in contact with the cells was collected and used to analyze death cell using the system image GE Incell Cell Analyzer 2000. Data were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis test followed by comparison Mann-Whitney ($p < 0.05$). All adhesive systems reduced the percentage of cell metabolism compared with the control group. The lowest value of SDH production was observed for G5, followed by G2. The reduction of cell metabolism were of 33.7%, 19.2%, 16.83%, 42.27%, 28.83% and 8.86% for G2, G3, G4, G5, G6 and G7, respectively. The cytotoxic potential of the adhesive systems were $G5 > G2 > G6 > G3 > G4 > G7$. G6 produced the weakest effect of inducing cell death by apoptosis. On the other hand, G2 and G7 groups produced the highest values (16.58% and 15.03%), respectively. The highest percentage of necrosis was induced by G2 (63.44%), statistically different from all groups, except from the G4. Necrotic cell death was the most prevalent type of cell death for all adhesives tested. All adhesive systems caused cell death (apoptosis and necrosis), reduction of cellular metabolism and alterations on cell morphology, indicating their cytotoxic potential for pulp cells.

Keywords: Cytotoxicity, cell culture, dentin bonding.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – área de superfície

AP – sítios apurínico/apirimidínico

BER – reparo por excisão de base

Bis-GMA – bisfenol A-glicidilmetacrilato

BRCA-1 – gene humano que pertence a classe dos genes supressores de tumor

CAT – catalase

cm – centímetro

cm² – centímetro quadrado

CO₂ – gás carbônico

CQ – canforoquinona

10-MDP – fosfato metacrilado insaturado

DMEM – Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (Meio de cultura modificado Dubelco)

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etil diamino tetracético

ERK – quinase regulada por sinal extracelular

EROs – espécies reativas de oxigênio

fase G0/G1 – fases do ciclo celular

fase G2/M – fases do ciclo celular

fase S – fase de síntese na qual ocorre a auto-replicação das moléculas de DNA

GPx – glutathione peroxidase 1

GSH – glutathione

H₂O – água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HEMA – metacrilato de 2-hidroxietil

HMDS – hexametildisilazano

IU/mL – *International Unit* por mililitro

IVPC – *in vitro pulp chambre* (câmara pulpar in vitro)

Jv – volume de fluido

L – litro

Lp – condutância hidráulica

M – molaridade
MEK – membro da cascata de sinalização da MAPK
MEV- microscopia eletrônica de varredura
min – minutos
mm – milímetro
mM – milimolar
mmol /L – milimol por litro
mW/cm² - miliwatts por cm²
MTT – metiltetrazolium
n – amostras por grupo
NAC – *N*-acetilcisteína
NF-κB – fator nuclear Kappa B
Nf-r2 – *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
nm – nanômetros
O₂⁻ – ânion superóxido
OH⁻ – radical hidroxila
OSO₄ – tetróxido de ósmio
PBS – solução tampão fosfato
pH – potencial hidrogeniônico
PI – iodeto de propídeo
Raf-1 – enzima codificada pelo gene RAF1
Ras – proteína transdutora do sinal extracelular
RAW264.7 – linhagem de macrófagos
rpm – rotações por minuto
s – segundos
SDH – enzima desidrogenase succínica
SFB – soro fetal bovino
-SH – grupo sulfidrílico
SOD – superóxido dismutase
sub-G0/G1 – fases do ciclo celular
t – tempo
TEGDMA – dimetacrilato de trietilenoglicol
Trx – tioredoxina
TrxR – tioredoxina redutase

UDMA – dimetacrilato de uretano

UV – radiação ultravioleta

$\mu\text{g/mL}$ - micrograma por mililitro

μL - microlitro

μm - micrômetro

ΔP – gradiente de pressão

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

™ - *trade mark* (marca registrada)

≥ - maior ou igual a

® - marca registrada

n° - número

°C – grau Celsius

± - mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 TÉCNICAS E TIPOS DE SISTEMAS ADESIVOS.....	17
2.2 ESTUDOS RELACIONADOS À CITOTOXICIDADE DOS SISTEMAS ADESIVOS.....	20
2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS MONÔMEROS PRESENTES NOS SISTEMAS ADESIVOS.....	24
3 OBJETIVOS	30
4 MÉTODOS	31
4.1 OBTENÇÃO DOS DISCOS DE DENTINA.....	31
4.2 DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA (CONDUTÂNCIA HIDRÁULICA)	33
4.3 CULTIVO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS SOBRE OS DISCOS DE DENTINA	34
4.4 PROCEDIMENTO ADESIVO	38
4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	41
4.6 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	43
4.7 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR	43
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5 RESULTADOS	45
5.1 VIABILIDADE CELULAR	45
5.2 MORTE CELULAR POR APOPTOSE (ANEXINA) E POR NECROSE (IODETO DE PROPÍDEO)	46
5.3 MORFOLOGIA CELULAR (MEV)	48
5.4 TIPO DE MORTE CELULAR (APOPTOSE E NECROSE)	50
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	57
8 REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	63

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de agentes de união com técnicas mais simples passou a ser uma tendência, segundo os conceitos da odontologia moderna. Esses apresentam menos passos operatórios, reduzindo a possibilidade de falhas, tais como condicionamento excessivo e desidratação da dentina, evitando-se assim problemas na adesão (1). Como reflexo dessa situação, vê-se o surgimento dos sistemas adesivos Universais, “Multi-purpose” ou “Multi-mode”. Esses adesivos são mais versáteis, pois incluem as opções da técnica convencional de dois passos e a autocondicionante de um ou dois passos (2, 3).

Contudo, para que isso fosse possível, houve a necessidade da incorporação de novos componentes aos monômeros e solventes presentes nesses materiais, alterando à sua formulação química e mecanismo de ação. O silano, a clorexidina e os copolímeros a base de ionômero de vidro são alguns exemplos dos componentes que fazem parte desses novos sistemas adesivos. A presença desses compostos pode modificar o comportamento desses sistemas adesivos frente ao substrato dentário além de poder induzir respostas biológicas ainda não esclarecidas, uma vez que, a informação na literatura sobre o desempenho dessa nova classe de sistemas adesivos é escassa (2, 3).

A matriz orgânica dos adesivos dentinários tem sido reconhecida como uma fonte de compostos que causam uma grande variedade de reações biológicas adversas (4). Tem sido relatado que esses compostos, como por exemplo, bisfenol A-glicidilmetacrilato (Bis-GMA); dimetacrilato de uretano (UDMA); dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA); metacrilato de 2-hidroxietil (HEMA) e canforoquinona (CQ), podem induzir intensas lesões celulares. Essa citotoxicidade é resultado da incompleta conversão monômero-polímero, a qual leva a liberação dessas substâncias monoméricas e aditivos para o ambiente oral (5), ou mesmo sua difusão para o espaço pulpar após a sua aplicação. Podendo, contudo, causar efeitos adversos locais e sistêmicos (6, 7).

Os efeitos sobre o tecido pulpar também são dependentes da permeabilidade (8, 9) e espessura do remanescente dentinário (8, 9, 10). Embora essa camada de dentina reduza os efeitos biológicos adversos, concentrações consideráveis de

monômeros (0,2-3,6 mM) têm sido estimadas por alcançar a polpa dentária, mesmo na presença de uma barreira intacta de dentina (11).

Os monômeros presentes nesses materiais interferem especificamente nas diversas funções celulares, tais como, produção de citocinas, processo de mineralização, diferenciação celular. Além disso, esses compostos podem induzir a apoptose relacionada com a modificação das vias de transdução do sinal e expressão de fatores de transcrição, além de morte por necrose (12).

As evidências atuais sugerem fortemente que o mecanismo por trás dessas respostas celulares específicas é resultante do estresse oxidativo gerado. Tem sido firmemente estabelecido que os monômeros de resina causam um esgotamento da glutathione um antioxidante intracelular (GSH), enquanto, paralelamente, aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (8, 9, 11, 12, 13).

Embora os detalhes dos mecanismos que resultam na citotoxicidade e genotoxicidade não são completamente compreendidos, sabe-se que os monômeros resinosos são capazes de alterar as funções celulares (4). Frente as essas evidências, esforços combinados estão sendo feitos no campo da toxicologia e biologia celular para melhorar a nossa compreensão a respeito dos possíveis efeitos dos monômeros resinosos sobre os tecidos, bem como proporcionar melhorias futuras nas técnicas e materiais odontológicos.

Tendo em vista o exposto, foi considerado oportuno avaliar *in vitro* a citotoxicidade transdentinária dos sistemas adesivos universais comparando-os com os demais sistemas não-universais sobre cultura de células da polpa. A hipótese nula testada foi que o tipo de sistema adesivo e a técnica de aplicação não influenciam a viabilidade e o tipo de morte (apoptose e necrose) celular em cultura primária de células da polpa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os sistemas adesivos sofreram grande aprimoramento desde de sua introdução há mais de 50 anos. O principal desafio para os adesivos dentários é o de apresentarem uma interação adesiva igualmente efetiva a dois tecidos duros de diferentes naturezas (14).

2.1 TÉCNICAS E TIPOS DE SISTEMAS ADESIVOS

O mecanismo fundamental de Adesão dos sistemas adesivos ao esmalte e à dentina baseia-se, essencialmente, num processo de troca no qual os minerais removidos dos tecidos duros dentários são substituídos pelos monômeros resinosos que, sob a polimerização, se tornam micromecanicamente interligados nas porosidades previamente criadas (15). Frente a isso, existem atualmente sistemas adesivos que seguem uma abordagem de “condicionamento total” ou de “autocondicionamento”, os quais diferem significativamente na maneira com que interagem com o tecido dentário. Contudo, deve-se afirmar que ambas as abordagens têm apresentado desempenhos bem sucedidos em laboratório, bem como nas pesquisas clínicas, enquanto, obviamente, ainda exista uma alta dependência do produto em si (14).

Os sistemas adesivos de condicionamento total são os mais antigos na evolução desses sistemas. Na versão de 3 passos, eles envolvem um condicionamento ácido, a aplicação de um *primer* e o uso posterior de um adesivo, em separado. O condicionamento ácido, usando ácido fosfórico a 32-37% (pH de 0,1 a 0,4) não apenas condiciona o esmalte e a dentina simultaneamente, mas o baixo pH elimina muitas das bactérias residuais (16).

O condicionamento ácido em esmalte transforma sua superfície lisa e suave em superfície acentuadamente irregular, permitindo que, diante da aplicação do material resinoso, ocorra a infiltração do monômero nas irregularidades produzindo uma interação micromecânica, estabelecendo a adesão (17). Já em dentina, o

condicionamento ácido remove completamente a *smear layer*, expõe os túbulos dentinários, aumenta a permeabilidade dentinária, dissolve a dentina peritubular com conseqüente alargamento da entrada dos túbulos dentinários e desmineraliza a dentina intertubular com dissolução dos cristais de hidroxiapatita e exposição de fibrilas de colágeno dispostas em forma de redes (18). Nesse passo, o ácido desmineraliza por completo a superfície de 5 a 8 µm da matriz intertubular da dentina (16), estando relacionado com o tipo, concentração, viscosidade, tempo de exposição e pH do material utilizado (19). Essa nova condição do substrato dentinário mostra-se propícia para a aplicação do *primer*.

Os *primers* são, geralmente, soluções ricas em HEMA e água que garantem uma completa expansão da malha das fibrilas de colágeno, umedecendo-as com monômeros hidrofílicos (16). A penetração do adesivo na dentina úmida desmineralizada só é possível devido à natureza hidrófila do *primer*, que tem afinidade por água, pela presença dos solventes orgânicos em sua composição, que penetram na dentina em busca de umidade, carreando os monômeros resinosos. Após a evaporação do solvente, esses monômeros são polimerizados ao redor das fibrilas de colágeno e da dentina desmineralizada pelo condicionamento ácido, promovendo uma retenção micromecânica (20). Assim, o grupo hidrófobo, contido no frasco de adesivo, tem afinidade à resina e finaliza a aplicação dos sistemas adesivos de 3 passos.

Para simplificar a técnica restauradora, surgiram os adesivos de frasco único (*one-bottle*), cujo mecanismo de união é similar aos adesivos de 3 passos. Tornam-se diferentes apenas porque o *primer* e o adesivo são incluídos no mesmo frasco (21). Os sistemas adesivos de frasco único têm chamado a atenção dos profissionais, uma vez que a facilidade de uso e a rapidez de aplicação são pontos importantes na seleção do material (22).

Uma das limitações dessa técnica é a presença e quantidade de umidade do substrato dentinário (20). Uma vez que, a umidade em excesso pode promover perda da qualidade da camada híbrida, devido à diluição do *primer* e dificuldades de penetração dos monômeros hidrofílicos ao longo da dentina desmineralizada (23, 24, 25). Em outro extremo, a desidratação da dentina condicionada provoca o colapso da rede de fibrilas de colágeno, diminuindo os espaços disponíveis para a infiltração do adesivo (26). Além de uma eventual discrepância entre a profundidade do substrato desmineralizado pelo condicionamento ácido e a real infiltração dos

monômeros (27), que pode resultar em regiões de dentina que, por não chegarem a ser hibridizadas, ficam enfraquecidas mecanicamente e sujeitas a nanoinfiltração.

Diferentemente dos adesivos de condicionamento total, os adesivos autocondicionantes não demandam de uma etapa separada de condicionamento, pois eles contêm monômeros ácidos que, simultaneamente, “condicionam” e desmineralizam e atuam como um “*primer*” no substrato dentário. Conseqüentemente, essa abordagem é considerada mais vantajosa (menor tempo de aplicação, menos passos) e menos sensível à técnica (a dentina pode estar úmida, secagem mais simples), o que por si só resulta em um desempenho clínico mais confiável (28) por mais que ainda pareça ser bastante dependente do produto empregado (14).

Os adesivos autocondicionantes podem se apresentar como adesivos de “dois passos” ou “de passo único”, dependendo se o *primer* autocondicionante (em sua maioria, livre de solventes) e a resina adesiva são fornecidos separadamente ou se encontram combinados em uma única solução. Os adesivos de passo único ainda podem ser subdivididos em adesivos de “dois componentes” ou de “um só componente”. Ao separarem os ingredientes “ativos” (como os monômeros funcionais da água), os adesivos autocondicionantes de dois componentes teoricamente possuiriam uma vida mais longa (em termos de armazenamento), mas eles demandarão uma mistura adicional adequada de ambos os componentes. Os adesivos de passo único de um só componente são os únicos que podem ser considerados como os verdadeiros adesivos “de frasco único” ou como adesivos “tudo em um”, na medida em que eles combinam o “condicionamento”, o “*primer*” e a “aplicação da resina adesiva” e não requerem misturas (14).

Em geral, os adesivos autocondicionantes possuem a vantagem de desmineralizar e infiltrar a superfície dental simultaneamente a uma mesma profundidade, teoricamente garantindo a completa penetração do adesivo (29). Em profundidades maiores, os monômeros ácidos são geralmente tamponados pelo mineral contido no substrato, perdendo sua habilidade de condicionar a dentina mais profundamente (30). Todos esses favoráveis fatores têm levado à sólida e crescente popularidade dos adesivos autocondicionantes na prática odontológica da atualidade (14).

A demanda por adesivos que sejam mais simples, mais práticos e menos sensíveis à técnica permanece alta, urgindo aos fabricantes o desenvolvimento de

novos adesivos a passos rápidos (14). Diante dessa realidade de mercado, alguns fabricantes lançaram sistemas adesivos que podem ser utilizados sob qualquer técnica de aplicação: condicionamento ácido total (com prévio condicionamento do esmalte e da dentina), autocondicionante (sem condicionamento ácido) ou com o condicionamento seletivo do esmalte. O surgimento desses sistemas adesivos, chamados de Universais, Multi-purpose ou Multi-mode, trouxe simplicidade, praticidade e versatilidade aos procedimentos de união adesiva. Assim sendo, para Hanabusa et al. (2) e Perdigão, Sezinando e Monteiro (3) esses materiais e o respectivo conceito por trás deles, são novos, portanto, há pouca informação na literatura sobre o desempenho dessa nova classe de sistemas adesivos.

2.2 ESTUDOS RELACIONADOS À CITOTOXICIDADE DOS SISTEMAS ADESIVOS

Conceitos da odontologia moderna foram baseados nas teorias de promoção de saúde, prevenção e estética. O advento de novos materiais e técnicas tem sido relacionado com o desenvolvimento atual da odontologia, com base em evidências científicas, que associam a funcionalidade com o significado de tais conceitos (1). Assim, o surgimento dos sistemas adesivos permitiu a recuperação de estruturas perdidas do dente com preparos minimamente invasivos (31). Esses materiais são utilizados para melhorar o contato entre a resina composta e as paredes da cavidade preparada do dente. Como esses sistemas entram em contato próximo e prolongado com a dentina vital, a sua influência sobre o tecido pulpar é fundamental. Dessa forma, a biocompatibilidade dos adesivos dentinários mostra-se um aspecto relevante do sucesso clínico desses materiais (32).

Há um consenso de que os adesivos dentários podem ser citotóxicos para as células da polpa quando aplicados em cavidades profundas. Vários estudos têm demonstrado a citotoxicidade desses materiais (1, 4, 6), mas a etiopatogenia das respostas pulpares não tem sido completamente compreendida, bem como o efeito dos adesivos sobre o ciclo celular. Silva et al. (1) atribuem esta toxicidade aos seus componentes. Dentre esses, os monômeros e co-monômeros resinosos livres, tais como HEMA, TEGDMA, Bis-GMA e UDMA (31), os quais são amplamente utilizados

nas suas composições, têm sido implicados como possíveis causadores de lesão celular pulpar (33).

A citotoxicidade desses materiais depende dos seus componentes, seus pesos moleculares e também das interações sinérgicas ou de antagonismo entre eles (34). Tem sido demonstrado que o BisGMA é o monômero mais tóxico, seguido sequencialmente pelo UDMA, TEGDMA e HEMA. O Bis-GMA, apesar do seu caráter hidrofóbico que limita a sua liberação em ambiente aquoso, pode ser considerado tóxico mesmo em baixas concentrações quando comparado com HEMA e TEGDMA. Por outro lado, sistemas adesivos que possuem HEMA na composição também podem ser citotóxicos, pois esse monômero, além de ser hidrofílico, possui baixo peso molecular o que possibilita sua difusão em grandes quantidades pela dentina, podendo atingir o tecido pulpar e conseqüentemente causar lesões celulares irreversíveis (35). No entanto, a citotoxicidade não é influenciada apenas pelas características individuais dos componentes, mas também por suas interações. Poskus et al. (34) evidenciaram que os agentes de ligação que continham Bis-GMA foram menos citotóxicos que os outros agentes que continham Bis-GMA, UDMA e HEMA e Bis-GMA e HEMA, o que demonstra que a combinação de substâncias interfere na toxicidade do material.

Outro importante aspecto nos estudos de citotoxicidade está relacionado à estabilidade dos componentes dos materiais resinosos em meio aquoso, mesmo após polimerização. De maneira geral, a dissolução dos sistemas adesivos polimerizados em meio aquoso pode atingir valores de 1,5 a 2,5% do seu peso total, dos quais, 5 a 10% são monômeros residuais não convertidos. Essa dissolução é decorrente das formulações altamente hidrofílicas resultando no aumento da susceptibilidade destes materiais à degradação hidrolítica. A maioria dos monômeros amplamente usados na composição dos adesivos dentinários, tais como TEGDMA, Bis-GMA e UDMA, são hidrofóbicos e não se difundem bem sob as condições aquosas encontradas *in vivo*. Quando utilizados em uma mistura com HEMA, a difusão desses monômeros pode ser facilitada porque o HEMA aumenta a característica de hidrofilia do material. Sob estas condições, alguns monômeros hidrofóbicos podem atingir e lesar componentes celulares (33).

A polimerização completa dos sistemas adesivos dificilmente é alcançada (1). Atualmente, não há conversão total dos monômeros durante a polimerização. Espera-se que, no final da polimerização inicial, a maior parte dos monômeros irão

reagir com a rede de polímeros e a quantidade de monômeros residuais será inferior a um décimo do restante dos grupamentos metacrilato (31). Adesivos dentários apresentam um risco elevado de polimerização incompleta porque eles são aplicados em finas camadas o que favorecem a inibição pelo oxigênio (36). Além disso, quando aplicados em cavidades profundas, os monômeros residuais decorrentes da polimerização incompleta podem atingir a polpa por difusão, e na dentina condicionada, esta penetração tende a ser mais elevada (1).

Evidências de transudação de fluidos dentinários após a aplicação dos sistemas adesivos atestam o fato de que esses não selam hermeticamente a dentina profunda vital (31). Os sistemas adesivos de condicionamento parecem deixar as fibrilas de colágeno expostas sob uma matriz de dentina incompletamente infiltrada. Isso, resulta em uma capacidade de vedação imperfeita das resinas adesivas à dentina, com hidrólise do colágeno por longos períodos. Com isso, tem-se a liberação de monômeros não convertidos dentro da camada híbrida e sua substituição por água causando efeitos deletérios à polpa. Esse selamento imperfeito permite que haja fluxo transitório de fluidos pela dentina hibridizada. Todavia, esses movimentos são suficientes para criar árvores de água que contribuem para a degradação da adesão resina-dentina (37).

Por outro lado, têm-se os adesivos autocondicionantes que promovem efeitos do condicionamento ácido mais leve mantendo a *smear plug* hibridizada dentro dos túbulos dentinários o que reduz o fluxo de fluido, resultando em vedação superior. Esse fato ficou comprovado no estudo de Hashimoto et al. (37), que observaram que a quantidade de fluxo de fluidos através da dentina hibridizada foi significativamente maior quando utilizou-se adesivos que utilizam condicionamento e lavagem do que os adesivos autocondicionantes.

Diferentes resultados de citotoxicidade para os sistemas adesivos podem ser explicados pelas diferenças na sua composição, técnica de aplicação e também das propriedades reológicas. Dentre essas propriedades, tem-se a viscosidade do material que ao ser menor, teoricamente torna sua difusão mais rápida e mais profunda. Como as substâncias fluidas têm uma velocidade maior de difusão, monômeros não polimerizadas podem difundir-se no fluido que preenche os túbulos dentinários durante os 20 segundos em que o *primer* ou o adesivo permanecem na dentina, antes da polimerização, como um resultado da técnica (36).

Sistemas adesivos muitas vezes são utilizados em cavidades profundas e seus componentes, tais como monômeros, ácidos, solventes e fotoiniciadores, podem passar através dos túbulos dentinários, antes e após sua polimerização, em particular quando a permeabilidade da dentina é alta, causando irritação pulpar (34). Essa permeabilidade é de especial interesse para a aderência de materiais à dentina e ao seu efeito biológico na polpa. A dentina atua como barreira de difusão e de adsorção, diminuindo, assim, a concentração de substâncias residuais. A camada de dentina existente absorve monômeros não reagidos e, por conseguinte, contribui para a redução da citotoxicidade do material (31). Numerosos estudos demonstraram que os componentes não polimerizados dos adesivos dentinários provocaram efeitos citotóxicos nas células pulpares por difusão através dos túbulos presentes na dentina (1, 31, 32, 35, 36, 38). Kusdemir et al. (31) relataram que quantidades suficientes dos componentes dos adesivos autocondicionantes foram lixiviados para o meio de cultura de células através da dentina, causando a supressão da atividade celular. Mostraram ainda que a espessura da dentina influenciou na concentração e na quantidade dos agentes de ligação que penetraram através da dentina para o espaço pulpar. Sendo que uma espessura de 0,5 mm de dentina reduziu a toxicidade do material a 75% e 1 mm de dentina pode reduzir a toxicidade em 90%.

É sabido que a remoção da camada de esfregaço com ácidos desmineralizadores aumenta a força de união da resina com o dente. No entanto, este procedimento elimina a camada e tampões de esfregaço, removendo, assim, uma barreira importante para a permeação de solutos e solventes. Além disso, alarga a entrada dos túbulos dentinários, e, conseqüentemente, aumenta a permeabilidade da dentina e eleva o risco de toxicidade. Dentes previamente condicionados com ácido fosfórico 37% apresentam uma taxa de difusão maior e mais rápida (36). Por outro lado, os adesivos autocondicionantes não removem completamente a camada de esfregaço, eles incorporam a *smear layer* como agente de união ao substrato (39). Logo, são considerados mais seguros que os sistemas adesivos de condicionamento total porque os monômeros resinosos não podem penetrar muito profundamente nos túbulos dentinários (34, 36).

Embora fatores como a espessura da dentina remanescente, permeabilidade (34), e localização da dentina possa alterar a difusão e influenciar a toxicidade dos materiais resinosos, um fator que causa preocupação é que os dentistas têm apenas

uma ideia subjetiva sobre esses fatores. Portanto, medidas devem ser tomadas para minimizar os riscos biológicos diretamente relacionados com a aplicação de adesivos dentinários em cavidades profundas. Uma vez que, clinicamente, é difícil avaliar o quanto a dentina permanece no assoalho da cavidade, devido à variabilidade anatômica de um indivíduo para outro, o tamanho da câmara pulpar, o julgamento do examinador, formação e extensão da dentina reparadora (36). Da Silva et al. (1), ao mostrarem que embora a dentina remanescente promova proteção da polpa em cavidades profundas, essa não é suficiente para evitar a penetração dos monômeros residuais, também propõem que estratégias devam ser escolhidas, a fim de proteger o complexo dentino-pulpar e permitir a regeneração dos tecidos envolvidos.

Os diversos estudos realizados nas últimas décadas demonstraram que os resultados das pesquisas sobre a biocompatibilidade dos materiais dentários realizados nos diferentes níveis de pesquisa (*in vivo* - em animais ou *in vitro* - em cultura de células) não podem ser extrapolados para situações clínicas em seres humanos. Todavia, os testes de citotoxicidade em cultura de células podem determinar o potencial agressivo dos materiais sobre as células e direcionar os cuidados que devem ser tomados quando da utilização e recomendação de aplicação desses materiais em procedimentos clínicos (40). Com isso, a compreensão dos mecanismos de citotoxicidade provocada por esses materiais faz-se necessária para a seleção de uma estratégia de proteção do complexo dentina-pulpar permitindo que haja cicatrização e regeneração desse tecido (41).

2.3 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS MONÔMEROS PRESENTES NOS SISTEMAS ADESIVOS

O sucesso clínico dos materiais resinosos depende não só das propriedades físicas e químicas, mas também de sua compatibilidade biológica. A matriz orgânica presente nesses materiais tem sido apontada como responsável por uma grande variedade de reações biológicas adversas (4). Tem sido relatado que os monômeros resinosos por exemplo, Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, HEMA e iniciadores como a CQ, podem induzir grave citotoxicidade devido à incompleta conversão monômero-

polímero e conseqüentemente liberação de substâncias monoméricas e aditivos para o ambiente oral (5), ou difusão para o espaço pulpar após a sua aplicação, podendo causar efeitos adversos locais e sistêmicos (6, 7).

Entre as substâncias lixiviáveis, os monômeros e (co) monômeros foram identificados como a principal causa de citotoxicidade (4, 5, 8). Os mecanismos de citotoxicidade estão, em primeiro lugar, relacionados a liberação a curto prazo de monômeros livres que ocorrem durante a conversão monômero-polímero. Em segundo lugar, a liberação a longo prazo dessas substâncias é gerada pela erosão e degradação ao longo do tempo (8). Essa liberação ocorre devido a deficiência na polimerização, fatores térmicos, mecânicos ou químicos.

Aproximadamente 15 a 50% dos grupos metacrílicos não são convertidos, gerando a presença de monômeros residuais. Sabe-se que até o momento, não há conversão total após a polimerização (8, 13, 42, 43, 44). Contudo, pode presumir-se que, no final da polimerização inicial, a maior parte dos monômeros irá reagir com a rede de polímero e a quantidade de monômeros residuais será menor do que um décimo dos grupos metacrílicos restantes, que seria em torno de 1,5-5%. No entanto, esta quantidade é suficiente para induzir os principais efeitos citotóxicos sobre os tecidos dentários (8).

Esses efeitos também são dependentes da permeabilidade (8, 9) e espessura da dentina residual (8, 9, 10). A camada de dentina residual limita a infiltração de monômeros não reagidos e, por conseguinte, contribui para a redução da citotoxicidade do material, mas este parâmetro não está diretamente sob o controle do cirurgião-dentista. Ainda, a permeabilidade da dentina pode ser reduzida por precipitação de cálcio/fosfato no lúmen dos túbulos dentinários, que conduzem à esclerose dentinária (8). Embora esses fatores reduzam os efeitos biológicos adversos, concentrações eficazes de monômeros (0,2-3,6 mM) têm sido estimado por alcançar a polpa dentária, mesmo na presença de uma barreira intacta de dentina (11).

Os monômeros presentes nos materiais restauradores como resinas compostas, sistemas adesivos e cimentos resinosos interferem especificamente nas diversas funções celulares, por exemplo, inibição da produção de citocinas, mineralização, diferenciação celular, ou na indução de apoptose (12).

Evidências atuais sugerem fortemente que o mecanismo envolvido nas respostas celulares específicas é a geração do estresse oxidativo. Sabe-se que os

monômeros resinosos causam um esgotamento de GSH, enquanto, paralelamente, aumenta a formação de EROs (8, 9, 11, 12, 13).

GSH é o principal antioxidante não enzimático e serve como um substrato de glutathione peroxidase para catalisar a redução de H_2O_2 em H_2O , sendo indispensável na manutenção do estado de tiol das proteínas essenciais (12). Ela está envolvida na desintoxicação celular e na manutenção do equilíbrio redox. GSH é um protetor eficiente contra lesões oxidativas gerados por vários xenobióticos e substâncias endógenas prejudiciais, especificamente EROs (5).

EROs são gerados em condições fisiológicas normais ou como consequência de estímulos endógenos ou exógenos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, endotoxinas bacterianas, radiação ou produtos químicos (12). As fontes primárias de EROs (peróxido de hidrogênio - H_2O_2 , ânion superóxido - O_2^- , radical hidroxila - OH^\cdot) dentro da célula incluem as mitocôndrias, as enzimas do citocromo P450, e os peroxissomos. No entanto, EROs também são gerados a partir de fontes externas, como resultado da exposição à luz UV, radiação ionizante e outros agentes ambientais (4). Contudo, concentrações elevadas de EROs para além da capacidade do equilíbrio redox celular causam lesões oxidativas nas macromoléculas celulares, como o DNA, proteínas e lípidos, e podem afetar a sinalização celular, resultando na morte celular por apoptose ou apoptose (12).

Essas espécies também estão envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular (45). Podem modular diretamente as cascatas de sinalização, ativando ou inibindo alguns fatores de transcrição e componentes de transdução do sinal celular ou, afetando indiretamente tal sinalização, alterando o estado redox celular (45). Altos níveis intracelulares de EROs, se não for combatido por antioxidantes celulares, pode ativar o fator NF- κ B (fator nuclear Kappa B), provavelmente, para neutralizar a apoptose induzida pelo monômero HEMA. Esse fator exerce um papel protetor contra a apoptose (4, 45).

O DNA é um alvo molecular para os componentes dos materiais resinosos. EROs são os principais agentes responsáveis por lesão ao DNA endógeno, que inclui produtos de oxidação de bases do DNA, sítiosapurínico/apirimidínico (AP), e quebras no DNA. Persistência de lesão no DNA induzidos por EROs poderia resultar na geração de mutações deletérias. O reparo por excisão de base (BER) é o principal processo responsável para o reparo de lesões de DNA induzidas por EROs e BRCA1 é discutida como um fator-chave para a reparação eficiente da lesão

oxidativa ao DNA gerados por EROs. Esses agentes genotóxicos geram uma variedade de lesões, incluindo a geração de quebras de cadeias simples ou duplas no DNA. Como resposta, o sistema de regulação molecular elaborado é ativado para manter a integridade do genoma celular. A conclusão com êxito das fases do ciclo celular (sub-G0/G1, fase G0/G1, fase S e fase G2/M) é controlada precisamente em vários pontos de controle do ciclo celular. Esses pontos de controle do ciclo celular funcionam ativando respostas nas células sobre lesão ao DNA através das atividades coordenadas por sensores, transdutores e proteínas efetoras. O ciclo celular pode então ser bloqueado para iniciar a reparação das lesões ao DNA ou para ativar a morte celular programada (apoptose). No entanto, defeitos na sinalização do ciclo celular são desastrosas para a integridade do genoma, porque eles podem levar a danos celulares irreversíveis como mutações genéticas ou danos cromossômicos. Esses fatos mostram a importância de EROs na indução de genotoxicidade, bem como o atraso do ciclo celular, e sugerem uma função central dessas moléculas no desencadeamento de vias que conduzem à morte celular (4).

A atividade citotóxica de um composto químico é indicado pela sua capacidade em induzir a morte celular. Dois mecanismos de morte celular, a necrose e apoptose foram identificados. Ambos seriam distinguidos com base em mudanças morfológicas e bioquímicas e seriam detectados pelas análise dessas alterações (41).

Necrose é um processo passivo de morte celular que resulta em rompimento da membrana celular e liberação de componentes celulares para a matriz extracelular (46). É definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam na rápida desregulação da homeostasia (47). Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina e a célula aumenta de volume, as mitocôndrias dilatam-se, juntamente com o retículo endoplasmático, e há desagregação dos ribossomos. Ocorre alteração na permeabilidade da membrana, rompimento de organelas e da membrana plasmática, com liberação de componentes intracelulares (48, 49), gerando inflamação.

Em contraste, a apoptose (morte celular programada), como um processo ativo, é estimulada por meio de sinais de desenvolvimento ou de fatores ambientais (46). Esse termo foi originalmente usado referindo-se a um padrão de morte celular com características morfológicas distintas da necrose (50). É um processo fisiológico altamente regulado de morte celular programada, caracterizada por alterações no

citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (51, 52, 53).

Mantellini et al. (54) relataram que, logo após a exposição a um sistema adesivo, a maioria das células da polpa revelou algumas alterações morfológicas relacionadas a apoptose. Esta observação levou à hipótese de que o modo como os odontoblastos são induzidos a morte celular pelos adesivos pode ser por apoptose e não por necrose. Para ratificar esses achados, estudos recentes demonstraram que os monômeros resinosos, como TEGDMA e HEMA têm o potencial de induzir apoptose *in vitro* (41). Além disso, também foi demonstrado que o BisGMA ativou a via de transdução de sinal da apoptose mediada por caspases. Essas pertencem à família de protease de cisteína que desempenham um papel central na desmontagem das células. Existem duas grandes vias de sinalização para ativar a cascata caspases, a extrínseca, via receptores de morte, e a intrínseca, por meio das vias mitocondrial. Essas vias causam a ativação de caspase-3, resultando na fragmentação do DNA, ampliando, assim, o sinal de apoptose. Enquanto que a caspase-3 é um fator central na indução de morte celular por apoptose, caspase-9, é o iniciador da via apoptótica mitocondrial e caspase-8 é um iniciador do receptor de morte por apoptose. Nesse estudo, portanto, foi relatado relações positivas entre o dano ao DNA e apoptose no tratamento de macrófagos com Bis-GMA. Sugerindo que a caspase-3, caspase-8 e caspase-9 desempenham um papel crítico na citotoxicidade e genotoxicidade induzida por Bis-GMA aos macrófagos da linhagem RAW264.7 (55).

Para manter a homeostase redox e as funções vitais das células, o equilíbrio dinâmico de EROs é fortemente regulado por antioxidantes não-enzimáticos como a GSH e os enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), tioredoxina (Trx), tioredoxina redutase (TrxR), glutathiona peroxidase 1 (GPx), glutathiona redutase, catalase (CAT), e outras enzimas relacionadas ou reguladoras de sua expressão (4, 12). O sistema de defesa antioxidante enzimático controla o estado oxidativo intracelular, metabolizando e eliminando diversificadas EROs, incluindo o H_2O_2 , O_2^- e OH^- , com o objetivo de um sistema redox equilibrado (12).

Tem sido relatado que os antioxidantes, tais como N-acetilcisteína (NAC), ascorbato (vitamina C), e Trolox (vitamina E), podem prevenir a toxicidade celular induzida por TEGDMA (5, 12, 45). NAC é um composto doador de cisteína que atua

como um precursor da glutathiona e pode diminuir o estresse oxidativo celular diretamente, como uma fonte de grupos sulfidril, que neutralizam EROs, ou indiretamente, restaurando o teor de glutathiona (4, 45). É conhecido por influenciar várias vias de sinalização de transdução, resultando na promoção da sobrevivência e diferenciação celular, redução da inflamação, ou indução de apoptose (12).

Spagnuolo et al. (45) demonstrou que a elevada concentração de NAC (5 e 10 mM), reduziu a produção de EROs e toxicidade induzida por HEMA mostrando uma reversão completa e significativa do efeito desse monômero. Sugere que este efeito protetor de NAC pode também estar relacionada com uma possível restauração do conteúdo de glutathiona reduzida ou de uma modulação de componentes de transdução de sinal celular sensível ao redox incluindo Ras, Raf-1, MEK, ERK e fatores de transcrição, tais como AP-1, NF-kB e NF-r2.

Embora os detalhes dos mecanismos que conduzem lesão ao DNA, como: mutações, morte celular (apoptose), perturbação do ciclo celular, alteração da expressão gênica, supressão do crescimento, diferenciação e proliferação celular, formação de micronúcleos (danos cromossômicos) não são completamente compreendidos, sabe-se que os monômeros resinosos são capazes de alterar as funções celulares. Caminhos que regulam a homeostase celular, ou a reparação dos tecidos pode ser modificado por monômeros em concentrações muito inferiores às que causam toxicidade aguda (4).

Frente às essas evidências, esforços combinados estão sendo realizados no campo da citotoxicidade e biologia celular para melhorar a nossa compreensão a respeito dos possíveis efeitos dos monômeros resinosos sobre os tecidos, bem como proporcionar melhorias futuras nas técnicas e materiais odontológicos.

3 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo geral:

- Avaliar a citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos universais e comparar aos demais sistemas não-universais sobre cultura de células pulpares.

Objetivo específico:

Testar a hipótese nula:

- A hipótese nula testada foi que o tipo de sistema adesivo e a técnica de aplicação não influenciariam a viabilidade e o tipo de morte (apoptose e necrose) celular em cultura primária de células da polpa.

4 MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS DISCOS DE DENTINA

Foram selecionados terceiros molares humanos hígidos, recém extraídos e armazenados em solução de água destilada com timol 0,9% a 4 °C (Figura 1), após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília sob protocolo n° 20/11 (Anexo 1). Os dentes, após remoção de restos do ligamento periodontal e debris aderidos à sua superfície, foram armazenados em água destilada até a obtenção dos discos de dentina.

Os dentes foram fixados em placas de resina acrílica com cera pegajosa de tal forma que o seccionamento fosse realizado por um disco de diamante (Struers) acoplado a uma máquina de cortes seriados (modelo Accutom-5, Struers) (Figura 2). Foram obtidos discos de dentina com 0,6 mm de espessura através do corte transversal da coroa dentária em duas regiões, sendo uma acima da projeção dos cornos pulpares e outra abaixo da junção amelo-dentinária oclusal (Figura 3).



Figura 1 – Dentes terceiros molares humanos hígidos.



Figura 2 – Máquina de corte

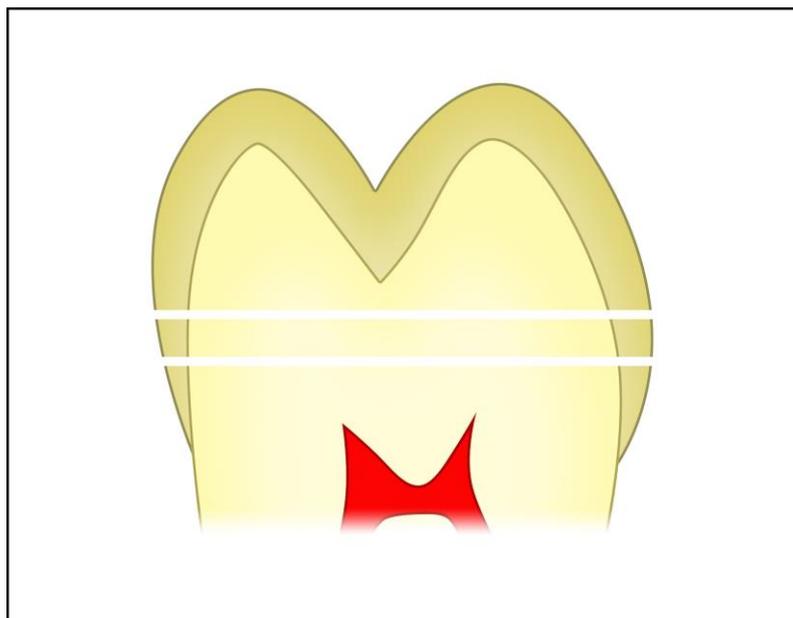


Figura 3 – Esquema ilustrativo da obtenção do disco de dentina.

Somente um único disco de dentina foi obtido de cada dente. A superfície desses discos foi examinada em microscópio estereoscópico (modelo SZX7, Olympus, São Paulo, SP, Brasil) para verificação da presença de esmalte no lado oclusal e defeitos resultantes da projeção dos cornos pulpares no lado pulpar. Portanto, foram utilizados discos que apresentassem apenas tecido dentinário em sua região central (Figura 4). Em seguida, os discos foram reduzidos apenas na superfície oclusal por meio de lixa de carbetto de silício (#320) umedecida com água destilada até a espessura final de $0,5(\pm 0,2)$ mm, mensurados por um paquímetro digital (150mm, JOMARCA, Guarulhos, SP, Brasil) (Figura 6). Os discos de dentina foram armazenados em água destilada a 4°C , até a leitura da permeabilidade.



Figura 4 – Discos selecionados para a realização do experimento.

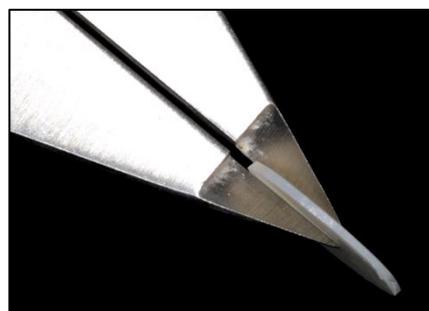


Figura 5 – Mensuração da espessura do disco de dentina por meio do paquímetro digital.

4.2 DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA (CONDUTÂNCIA HIDRÁULICA)

A permeabilidade dentinária foi medida utilizando a condutância hidráulica (L_p) pela filtração. A condutância hidráulica baseia-se na medição do volume de fluido forçado através do disco de dentina sob uma pressão hidrostática constante, por unidade de área, por unidade de tempo e por unidade de pressão, de acordo com a fórmula:

$$L_p = \frac{Jv}{A \cdot \Delta P \cdot t}$$

Onde, L_p é a condutância hidráulica ($\mu\text{L} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm H}_2\text{O}^{-1}$); Jv é o volume de fluido em μL ou distância percorrida por uma bolha em mm; A é a área de superfície de dentina em cm^2 , ΔP é o gradiente de pressão em $\text{cm H}_2\text{O}$; e t é o tempo em minutos.

Para avaliar a filtração máxima de fluido de cada amostra, os dois lados do disco foram condicionados com solução de EDTA 0,5 M (pH 7,2) durante 60 segundos, seguido de lavagem com água destilada. Com isso, removeu-se a *smear layer* criada durante o desgaste, padronizando desta forma, os espécimes para o teste de permeabilidade. Em seguida, cada disco foi posicionado em um dispositivo denominado câmara pulpar *in vitro* (*in vitro pulp chamber, IVPC*) ou câmara de filtração.

Essa câmara apresenta uma porção superior e uma inferior que são adaptadas por rosqueamento e recebe o disco de dentina para a realização das medições da condutância hidráulica. A câmara de filtração representa a parte final de um sistema complexo que determina a permeabilidade dos discos de dentina.

Uma cânula metálica presente na IVPC foi conectada por meio de um tubo de polietileno a uma micropipeta justaposta a uma escala de medição em milímetros, que serviu para medir o deslocamento do líquido numa fração de tempo, conforme a velocidade de filtração dos discos de dentina. Por conseguinte, essa micropipeta também se une a uma coluna de água a uma altura de 180 centímetros por meio de

um tubo de polietileno. Dessa forma, o sistema começa a funcionar quando a válvula dessa coluna de água é aberta e libera a água que exerce uma pressão hidrostática. Assim, o deslocamento de água é visualizado através da movimentação de uma microbolha criada por uma seringa acoplada a uma extensão capilar entre a micropipeta e a câmara de filtração. Logo, o disco permaneceu sob esta pressão por 5 minutos, após os quais a movimentação dessa microbolha de ar introduzida na cânula foi registrada durante 30 segundos e os valores obtidos (J_v) transformados em valor de condutância de acordo com a fórmula apresentada (Figura 6).

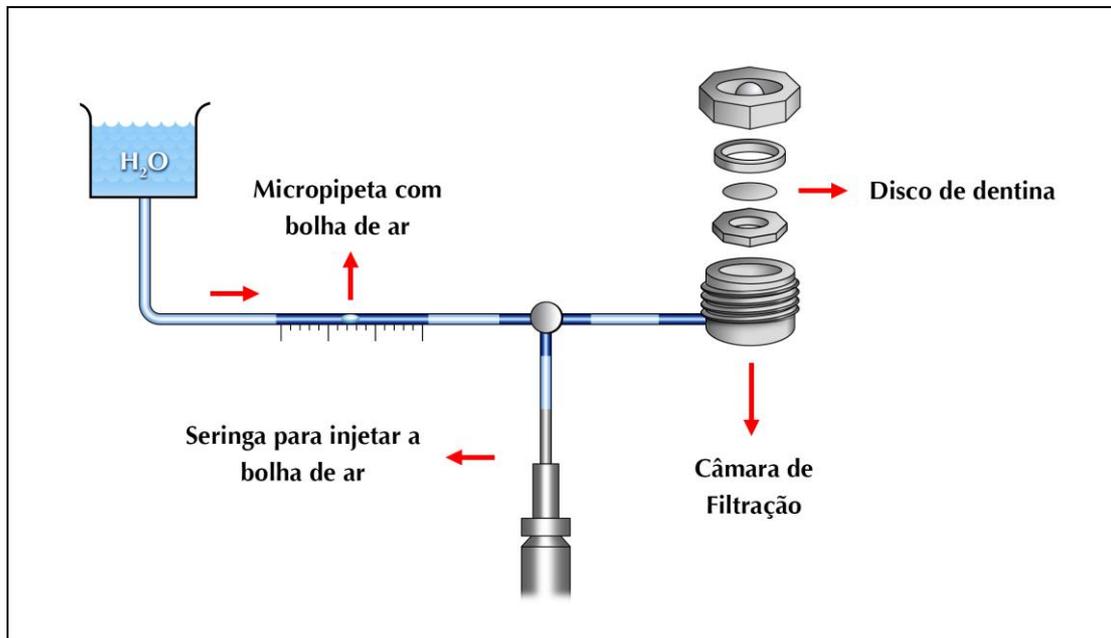


Figura 6 – Esquema ilustrativo do sistema utilizado para medição da condutância hidráulica.

Depois de determinar a condutância hidráulica, setenta discos foram divididos em 7 grupos ($n = 10$), de modo que não houvesse diferença estatisticamente significativa entre os valores numéricos médios de permeabilidade obtidos para cada grupo.

4.3 CULTIVO DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS SOBRE OS DISCOS DE DENTINA

Células oriundas do cultivo primário da polpa humana foram cultivadas em garrafas plásticas com área de base de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C. Essas células foram subcultivadas a cada três dias até a obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento (Figura 7).

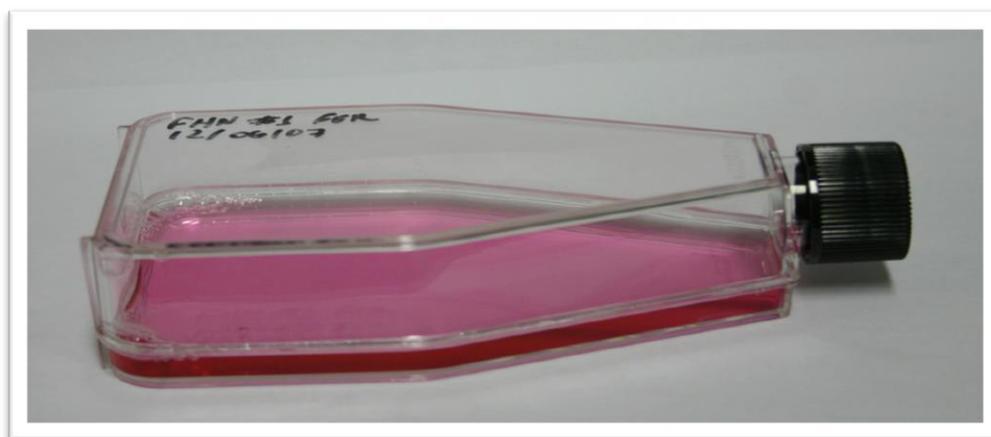


Figura 7 – Cultivo de células da polpa humana em garrafa plástica.

Para realizar os testes de citotoxicidade, os discos de dentina foram desgastados em sua área total com auxílio de ponta diamantada cilíndrica (n° 2143 KG Soresen, Barueri, São Paulo, Brasil), de forma que o diâmetro final fosse de 8mm (Figura 8). Além disso, o lado oclusal dos discos de dentina foi levemente lixado utilizando lixa de carbetto de silício de granulação 320 por 10 segundos, apenas para devolver a *smear layer* aos discos e, com isso, aproximar de uma condição clínica (Figura 9).

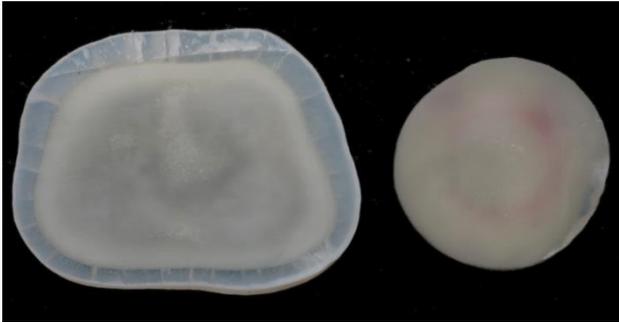


Figura 8 – Redução dos discos de dentina (8mm de diâmetro) com auxílio de alta rotação e broca diamantada cilíndrica.



Figura 9 – Formação da *smear layer*.

Em seguida, os discos de dentina foram posicionados em um dispositivo que simula a câmara pulpar. Esse dispositivo confeccionado em aço inoxidável, apresenta formato cilíndrico com 9mm de altura e abertura de 8mm até os 4 primeiros milímetros, havendo uma redução para 6mm. Tal característica permite que o disco de dentina seja adaptado corretamente. Existem perfurações no compartimento inferior que permitem a livre difusão do meio de cultura entre as partes externa e interna da câmara pulpar (Figura 10).



Figura 10 – Câmara pulpar *in vitro*.



Figura 11 – Adaptação dos anéis de silicone no dispositivo.

Os discos de dentina foram posicionados nos dispositivos entre dois anéis de silicone “o-ring” (Orion – São Paulo, SP, Brasil) com diâmetro interno de 4,47mm e espessura de 1,78mm (Figura 11). Os anéis mantêm o disco em posição além de permitirem o vedamento lateral. Não havendo possibilidade do sistema adesivo, ao

ser aplicado na superfície oclusal do disco de dentina, escoar pelas laterais do dispositivo atingindo o meio de cultura (Figuras 12A e 12B). Em seguida, esse conjunto foi esterilizado por meio de gás de óxido de etileno (Acecil Central de Esterilização Comercial Ltda, Campinas, SP, Brasil).



Figura 12 (A) – Posicionamento do disco de dentina na câmara pulpar *in vitro*, entre os anéis de silicone.



Figura 12 (B) – Aspecto final do conjunto.

30.000 células em meio de cultura DMEM completo foram plantadas sobre o lado pulpar dos discos de dentina, correspondente a uma área de 0,28 cm². Para tanto, as câmaras pulpares foram colocadas em placas de 24 poços (COSTAR 3595 – Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) em posição invertida por 48 horas e mantidas em atmosfera umedecida de 5% de CO₂, na temperatura de 37°C durante todas as etapas do cultivo (Figuras 13A e 13B). Passado as 48 horas, as células da polpa humana entram em confluência sobre a superfície pulpar do disco de dentina, simulando a camada odontoblástica, a qual reveste internamente a câmara pulpar em dentes íntegros. Logo, as câmaras pulpares foram revertidas para que os procedimentos adesivos fossem realizados sobre o lado oclusal dos discos, simulando as condições clínicas.

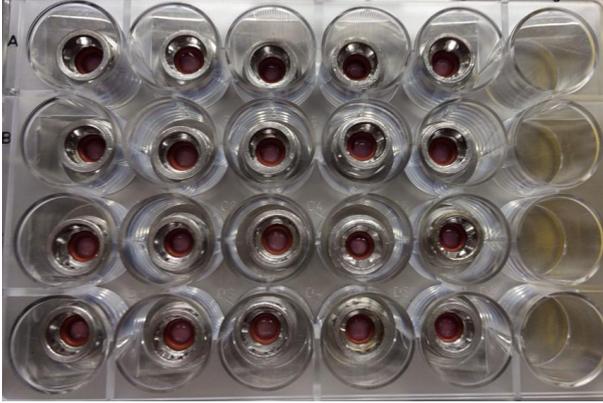


Figura 13 (A) – IVPC posicionadas de modo invertido no compartimento da placa com 20 μ L de células com meio sendo semeadas para permitir aderência inicial das células pulpares na face pulpar dos discos de dentina.



Figura 13 (B) – Preenchimento do compartimento com 1 mL de DMEN para possibilitar o plantio celular.

4.4 PROCEDIMENTO ADESIVO

Os sistemas adesivos utilizados nesse experimento (Figura 14) estão classificados e apresentados na Tabela 1.



Figura 14 – Materiais utilizados no experimento.

Tabela 1 – Materiais testados e siglas, fabricante/número do lote, classificação, e principais componentes

Materiais	Lote	Fabricante	Classificação	Componentes
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (G2)	1308100964	3M/ESPE Dental Products (St. Paul, MN, USA)	Convencional de 3 passos	Primer: 2-hidroxietilmetacrilato e ácido polialcenoico Adesivo: Bismetacrilato de (1-metiletilideno)bis [4,1-fenilenooxi (2-hidroxi-3,1-propanodilo)] e metacrilato de 2-hidroxietila
Clearfil™ Bond Plus (G3)	S ³ S2890-KA- 01	Kuraray Medical Inc. (Okayama, Japan)	Autocondicionante de passo único	10 MDP, Bis-GMA, HEMA, Dimetacrilato alifático hidrófilo, Metacrilato alifático hidrofóbico, Sílica coloidal, Fluoreto de sódio, Canforoquinona, Aceleradores, Iniciadores, Etanol e Água
Scotchbond™ Universal (G4 – G5)	41258	3M/ESPE AG – Seefeld, Germany	Autocondicionante de passo único e convencional de 2 passos	Bis-GMA, 2-hidroxietil metacrilato decametileno dimetacrilato, Etanol, Água, Sílica tratada com silano, 2-propanoico ácido 2-metil-, produtos da reação com 1,10-decanodiol e Pentóxido de fósforo (P2O5), Copolímero de acrílico e ácido itacônico, canforoquinona, 4-(Dimetilamino)-benzoato, Tolueno
Peak® Universal (Peak SE Primer e Peak LC Bond) G6 – G7)	112811	Ultradent Products, Inc. (Utah, USA)	Autocondicionante de 2 passos e convencional de 2 passos	Primer: álcool etílico, ácido metacrílico, 2-hidroxietil metacrilato Adesivo: álcool etílico, clorexidina 0,2% e 2-hidroxietil metacrilato
Ácido Fosfórico (Scotchbond™ Universal Etchant)		3M/ESPE AG – Seefeld, Germany	Gel	Ácido fosfórico a 35%, espessante composto por sílica pirogênica e tensoativo solúvel a água

Bis-GMA, bisfenol A-glicidilmetacrilato; HEMA, metacrilato de 2-hidroxietil; 10-MDP, 10- Metacrilodecilo fosfato dehidrogenado

Quatro sistemas adesivos foram avaliados neste estudo e os grupos (n=7) foram divididos de acordo com o tipo de adesivo e técnica de aplicação. Os grupos experimentais e controle foram definidos da seguinte forma: G1 - controle (PBS), G2 – convencional de 3 passos (Adper™ Scotchbond™ Multi-purpose, 3M/ESPE Dental Products - St. Paul, MN, USA); G3 – autocondicionante de passo único (Clearfil™ SE³ Bond, Kuraray Medical Inc. - Okayama, Japan); G4 e G5 - autocondicionante de passo único e convencional de 2 passos, respectivamente (Scotchbond™ Universal, 3M/ESPE AG – Seefeld, Germany); G6 e G7 – autocondicionante e convencional de

2 passos, respectivamente (Peak® Universa Bond, Ultradent Products – Utah, USA). Depois do condicionamento ácido, lavagem e secagem, no caso dos sistemas convencionais, (Figuras 15A e B) foi aplicado dez microlitros (10µL) de adesivo na superfície oclusal dos discos de dentina, de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 2) . Após evaporação, os adesivos foram fotopolimerizados por 10 segundos por meio de uma unidade de fotoativação LED Bluephase (Bluephase, Ivoclar Vivadent, Amhest, NY, EUA) com uma intensidade de luz $\geq 1000 \text{ mW/cm}^2$ (Figuras 16A e B).

Tabela 2 – Modo de aplicação dos sistemas adesivos utilizados de acordo com as instruções do fabricante		
Sistema Adesivo	Autocondicionante	Convencional
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (G2)	N.A	Condicionamento ácido por 15 s Lavagem por 20 s Remoção do excesso de água Aplicação do primer por 10 s (5 µL) Secagem suave com jato de ar por 5 s Aplicação do adesivo por 10 s (5 µL) Fotopolimerização por 10 s
Clearfil™ S ³ Bond Plus (G3)	Aplicação do adesivo por 10 s (10 µL) Secagem suave com jato de ar por 5 s Fotopolimerização por 10 s	N.A
Scotchbond™ (G4 –G5)	Universal	1. Aplicação do adesivo por 20 s (10 µL) 2. Secagem suave com jato de ar por 5 s 3. Fotopolimerização por 10 s
Peak® Universa Bond e Peak® SE (G6- G7)	1. Aplicação do primer por 20 s (5 µL) 2. Secagem suave com jato de ar por 3 s 3. Aplicação do adesivo por 10 s (5 µL) 4. Secagem suave com jato de ar por 10 s 5. Fotopolimerização por 10 s	1. Condicionamento ácido por 15 s 2. Lavagem por 20 s 3. Remoção do excesso de água 4. Aplicação do adesivo por 10 s (10 µL) 5. Secagem suave com jato de ar por 10 s 6. Fotopolimerização por 10 s

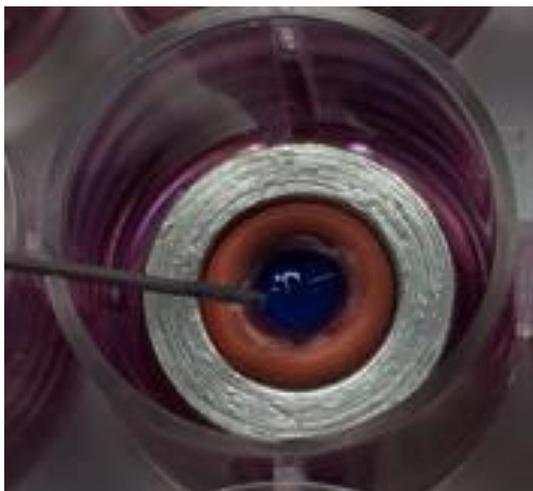


Figura 15 (A) – Aplicação do ácido fosfórico por 15 s.



Figura 15 (B) – Lavagem e secagem da superfície dentinária.



Figura 16 (A) – Aplicação de 10 µL do sistema adesivo.



Figura 16 (B) – Fotopolimerização por 10 s.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Quatro discos de dentina de cada grupo foram utilizados para a avaliação do metabolismo celular. Essa foi realizada por meio da análise da aplicação do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolína), a qual determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias

presentes nas células. Para tanto, após 24 horas da aplicação dos adesivos, as câmaras pulpares *in vitro* foram transferidas para outra placa de 24 poços com a face pulpar voltada para cima e o extrato que permaneceu em contato com elas foi removido delicadamente com o auxílio de uma micropipeta. Dessa forma, para cada amostra, foram adicionados 900 μL de DMEM e 100 μL de solução de MTT (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), numa concentração de 5mg do sal/ml de PBS, sendo incubadas por 4 horas a 37°C em 5% CO_2 e 95% de ar (Figuras 17A e B). Para finalizar, essa solução foi aspirada e então 100 μL de isopropanol acidificado foi aplicado sobre os discos, e após homogeneização foi depositado em uma placa de 96 poços (Figura 18) para que fosse quantificado por meio de um leitor universal de Elisa a uma absorvância de 570nm (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China). Todos os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes em momentos diferentes.



Figura 17 (A) – Solução de MTT aplicado sobre as células presentes nos discos de dentina.

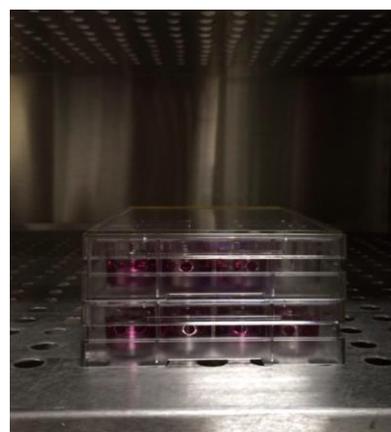


Figura 17 (B) – Amostras incubadas por 4 horas.

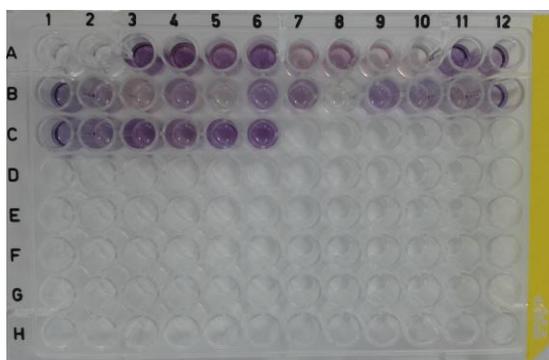


Figura 18 - Alíquotas de 100 μL obtidas pela dissolução dos cristais violeta.

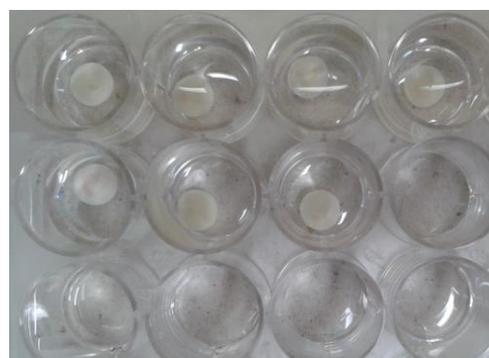


Figura 19 – Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.6 ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para cada grupo, dois discos de dentina foram utilizados para análise da morfologia celular. Para isso, os discos contendo as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 1 hora, sendo delicadamente lavadas com PBS por 15 minutos e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (OSO_4) por 1 hora. Uma nova lavagem foi realizada e as células foram então desidratadas numa série de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 95% e 100%) (Figura 19). Em seguida, os espécimes foram lavados por duas vezes com 200 μL de HMDS - Hexametyldisilazane (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), por 20 minutos cada. Após 24 horas em dessecador, os discos foram montados em *stubs* metálicos e cobertos com ouro para análise em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Carl. Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha).

4.7 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR

6.000 células em meio de cultura DMEM completo foram plantadas sobre a base do compartimento da placa de 96 poços (Figura 20). Após 48 horas, removeu-se o meio DMEM e 100 μL do meio de cultura contendo os produtos da difusão dos adesivos pela dentina (eluato) foram aplicados e mantidos em incubadora por 24 horas. Passado esse tempo, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos e, por fim, o eluato foi aspirado. Para a definição do tipo de morte celular, 20 μL de uma solução contendo uma proporção de 5 μL de Anexina V/1 μL de Iodeto de Propídio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi aplicada em cada compartimento e aguardado um período de 15 minutos. Logo depois, as células foram centrifugadas (4000 rpm – 2 min) e a solução de AnexinaV/PI foi removida para que 50 μL da solução de Hoescht pudesse ser inserida. A partir disso, foi possível realizar a análise do tipo de morte celular por meio do sistema de imagem celular GE InCell Analyzer 2000 (LS&E Infrastructure Unit) (Figura 21). Os dados obtidos determinam o número de células marcadas com cada reagente a partir do número total de células reconhecidas pelo sistema de imagem acima mencionado.



Figura 20 – Plantio de seis mil células na placa de 96 wells.



Figura 21 - Análise do tipo de morte celular por meio do aparelho In Cell Analyzer 2000.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise estatística para verificação de diferenças ou não entre os grupos, em relação ao metabolismo e ao tipo de morte celular. Essas análises foram realizadas utilizando o programa SPSS versão 21. Foram aplicados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis seguido do teste comparativo de Mann-Whitney, todos ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR

Os valores de produção da enzima desidrogenase succínica pela cultura primária de células da polpa, de acordo com os sistemas adesivos e técnicas adesivas testadas estão apresentadas na Tabela 3. Todos os grupos diferiram estatisticamente do grupo controle (G1), exceto G7, apesar de ter sido observado uma redução de cerca de 8,9% aproximadamente. Esses dados demonstram que os sistemas adesivos utilizados nos grupos G2, G3, G4, G5 e G6 apresentaram-se citotóxicos às células da polpa, uma vez que os valores de metabolismo celular foi reduzido significativamente quando em contato indireto com esses adesivos.

Os menores valores de produção da enzima SDH foram observados para os grupos G5 seguido pelo G2. Sendo que esse último não apresentou diferença estatisticamente significativa dos demais grupos em que se realizou a técnica adesiva. O G5 foi o único grupo que mostrou-se estatisticamente diferente de todos os outros, sendo considerado o mais citotóxico neste estudo. De acordo com esta pesquisa, foi observado que G2, G3, G4, G5, G6 e G7 reduziram o metabolismo em 33,7%, 19,2%, 16,83%, 42,27%, 28,83% e 8,86%, respectivamente. Em geral, o potencial citotóxico dos adesivos testados pode ser classificado como se segue: G5 > G2 > G6 > G3 > G4 > G7.

Tabela 3: Produção da enzima desidrogenase succínica (%SDH) pela cultura primária de células da polpa de acordo com os sistemas adesivos e técnicas adesivas testadas.

Grupos	
Sistemas Adesivos	% SDH ± Desvio Padrão
G1 (Controle)	100.02 (±15.26) ^a
G2	66,30 (±2.65) ^{cd}
G3	80.80 (±15.20) ^{bc}
G4	83,17 (±5.88) ^{bc}
G5	57.73 (±10.84) ^e
G6	71.17 (±18.63) ^{bcd}
G7	91.14 (±19.06) ^{abc}

Letras minúsculas permitem comparações entre colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

5.2 MORTE CELULAR POR APOPTOSE (ANEXINA) E POR NECROSE (IODETO DE PROPÍDEO)

As Tabelas 4 e 5 apresentam a porcentagem de morte da cultura primária de células da polpa por apoptose (anexina) e por necrose (iodeto de propídeo) em função dos sistemas adesivos aplicados sobre os discos de dentina, respectivamente. Os resultados revelaram que o tratamento realizado no G6 produziu o efeito mais fraco de indução de apoptose nas células da polpa, não apresentou diferenças estatisticamente significantes dos grupos G1 (controle), G3 e G5, ou mesmo entre eles. Por outro lado, os grupos G2 e G7 resultaram nos maiores valores de morte celular por apoptose (16,58% e 15,03%), respectivamente, com diferença estatística dos demais grupos avaliados.

Tabela 4: Porcentagem de morte da cultura primária de células da polpa por apoptose em função dos sistemas adesivos aplicados sobre os discos de dentina.

Grupos Sistemas Adesivos	% Apoptose ± Desvio Padrão
G1 (Controle)	9.63 (±2.13) ^{ab}
G2	16.58 (±2.91) ^c
G3	9,43 (±2.12) ^{ab}
G4	13.91 (±5.84) ^{bc}
G5	11.99 (±3.76) ^{abc}
G6	7.42 (±1.37) ^a
G7	15.03 (±2.97) ^c

Letras minúsculas permitem comparações entre colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$).

Todos os tratamentos resultaram em morte celular por necrose. A maior porcentagem de células mortas por necrose foi induzida pelo grupo G2 (63,44%), sendo esta estatisticamente significativa de todos os grupos, exceto para o G4. Morte celular por necrose foi o tipo mais prevalente para todos os adesivos estudados (Figura 22).

Tabela 5: Porcentagem de morte da cultura primária de células da polpa por necrose em função dos sistemas adesivos aplicados sobre os discos de dentina.

Grupos Sistemas Adesivos	% Necrose ± Desvio Padrão
G1 (Controle)	20.20 (±1.88) ^a
G2	63.44 (±11.21) ^b
G3	23.63 (±4.38) ^a
G4	34.35 (±12.59) ^{ab}
G5	22.99 (±1.36) ^a
G6	19.38 (±1.43) ^a
G7	21.56 (±1.85) ^a

Letras minúsculas permitem comparações entre colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$).

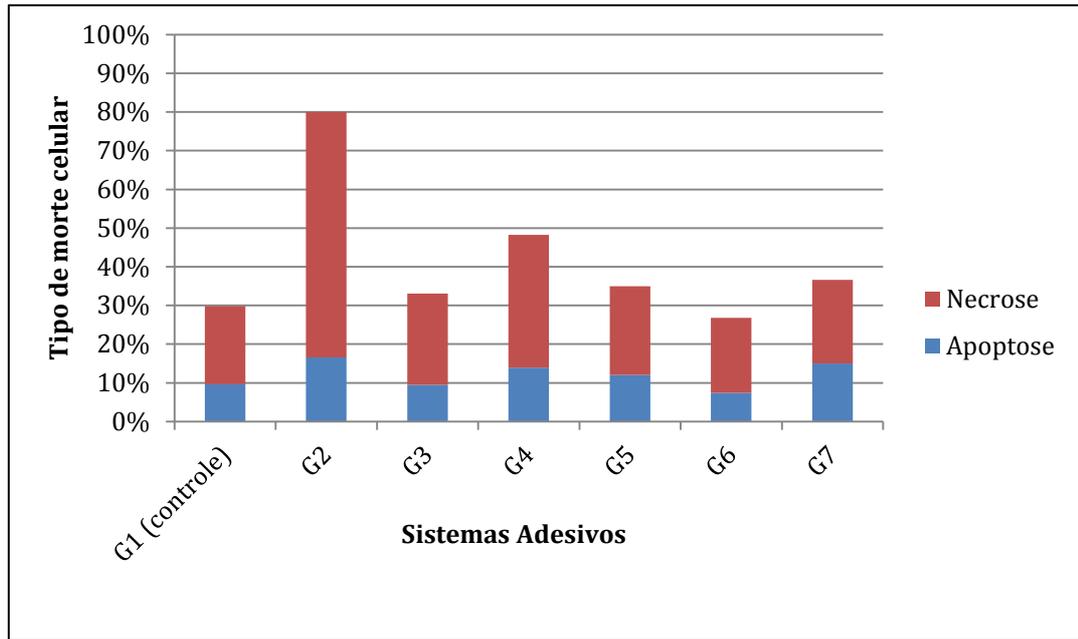


Figura 22 - Frequência, em porcentagem, do tipo de morte (apoptose e necrose) das células pulpares em função dos sistemas adesivos aplicados sobre os discos de dentina.

5.3 MORFOLOGIA CELULAR (MEV)

A superfície pulpar dos discos de dentina dos grupos G1 (controle) e G3 apresentaram-se recobertas por um grande número de células com morfologia afilada, morfologia achatada e com múltiplas projeções citoplasmáticas (Figuras 23A e 23C). Essas projeções são responsáveis por aderir as células pulpares à dentina, sendo capazes de permear os túbulos dentinários. Para os grupos G2 (Figura 23B), G4 (Figura 23D) e G6 (Figura 23F), observou-se uma quantidade reduzida de células que permaneceram aderidas aos discos de dentina. Além disso, a forma arredondada, tamanho reduzido e redução do prolongamento citoplasmático foram algumas características marcantes para essas células. Já os grupos G5 (Figura 23E) e G7 (Figura 23G) apresentaram poucas áreas de dentina exposta e algumas células com alteração da morfologia, exemplificada por uma contração do citoplasma.

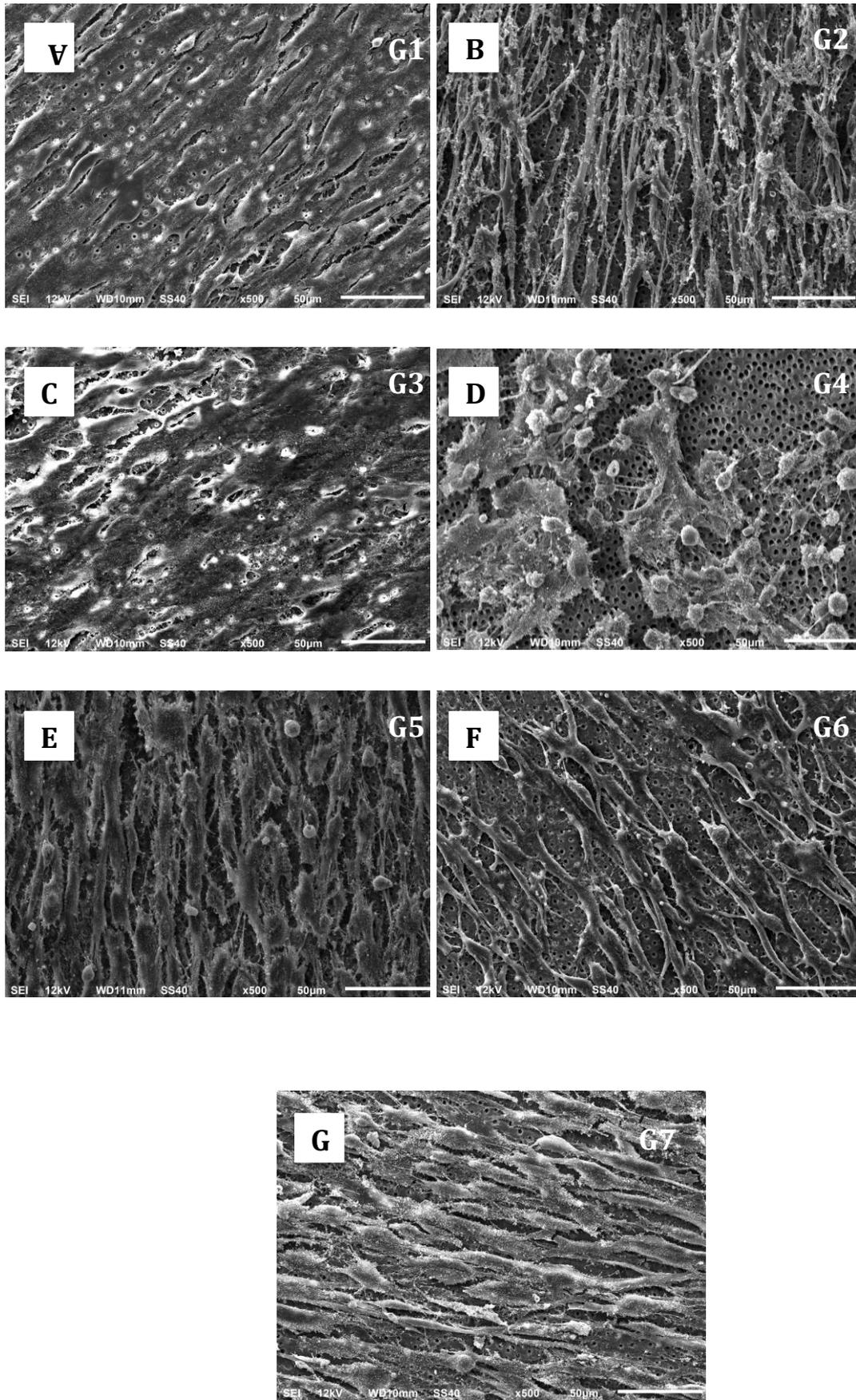
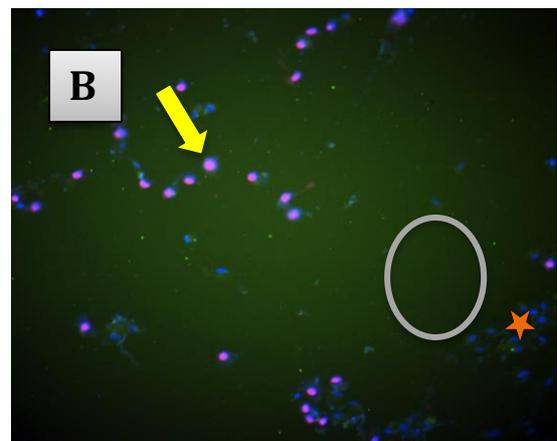
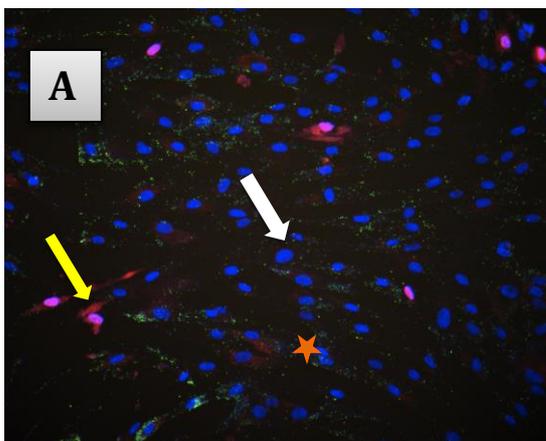


Figura 23 - Fotomicrografias representativas da morfologia celular de cada grupo. (A) e (C)

Células pulpares com morfologia afilada e achatada, com múltiplas projeções citoplasmáticas ocupando a maior parte da superfície pulpar dos discos de dentina. MEV x500. (B), (D) e (F) Ampla área de dentina exposta. Note a forma arredondada, tamanho reduzido e diminuição do prolongamento citoplasmático para essas células. MEV x500. (E) e (G) Poucas áreas de dentina exposta e algumas células com alteração da morfologia são observadas. (A) – controle; (B) - Adper™ Scotchbond™ Multi-purpose; (C) - Clearfil™ SE³ Bond; (D) e (E) - Scotchbond™ Universal; (E) e (F) - Peak® Universal Bond.

5.4 TIPO DE MORTE CELULAR (APOPTOSE E NECROSE)

A utilização de Anexina V e Iodeto de propídeo foram utilizadas para caracterizar o tipo de morte (apoptose e necrose) induzida pelos tratamentos adesivos propostos neste estudo. Podemos observar o padrão de coloração fluorescente azul pelo Hoeschst (Figuras 24 A, 24C e 24D) representando as células viáveis. A Figura 24B, por sua vez, mostra que esse tratamento induziu às células da pulpa a um maior número de apoptose e necrose em relação aos outros grupos. Fato esse, confirmado nas Tabelas 4 e 5, cuja porcentagem de apoptose foi de 16,58% e de necrose 63,44%. Células apoptóticas marcadas pela Anexina V e restos celulares identificados pelo processo de necrose através do marcador nuclear fluorescente Iodeto de propídeo foram vistos em todas as figuras 24(A, B, C e D).



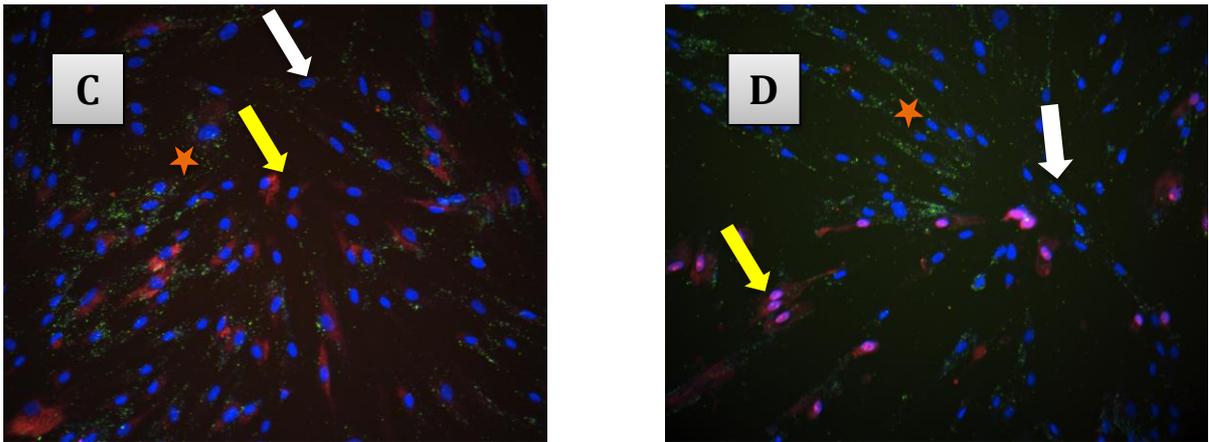


Figura 24. Ensaio de apoptose e necrose. Cultura primária de células da polpa tratadas com: (A) controle; (B) Adper™ Scotchbond™ Multi-purpose; (C) e (D) Peak® Universal Bond/técnicas autocondicionante e convencional, respectivamente. (A) Presença de células viáveis, células apoptóticas e restos celulares identificados pelo processo de necrose. (B) Ausência de células, células em processo de apoptose e necrose. (C) Presença de células viáveis, em processo de apoptose e necrose. (D) Células viáveis, apoptóticas e restos celulares identificados pelo processo de necrose. Seta branca: núcleos das células viáveis corados pelo Hoechst com fluorescência no espectro azul. Seta amarela: Células identificadas pelo processo de necrose corados com Iodeto de propídeo com fluorescência vermelha. Círculo cinza: Ausência de células. Estrela laranja: Células em processo de apoptose coradas com Anexina V apresentando fluorescência no espectro verde.

6 DISCUSSÃO

Há um consenso de que os adesivos dentinários podem ser citotóxicos para as células da polpa quando aplicados em cavidades profundas (9). Isso deve-se ao fato de que seus componentes, tais como monômeros, ácidos, solventes e fotoiniciadores, podem atravessar os túbulos dentinários, antes e após sua polimerização, em particular quando a permeabilidade da dentina é alta, causando lesão celular (34). Essa permeabilidade é de especial interesse tanto para a aderência de materiais à dentina quanto para o seu efeito biológico na polpa (31). Dessa forma, a presente pesquisa avaliou a citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos utilizando discos de dentina com espessura de 0.5 mm e células pulpares obtidas a partir de cultura primária. Essa metodologia reproduz um desafio extremo de exposição das células aos componentes lixiviados dos materiais estudados por simular a aplicação dos sistemas adesivos em cavidades muito profundas. Ainda, o estudo com barreira de dentina melhora a correlação entre os resultados laboratoriais e clínicos, sendo mais adequado para estimar a resposta *in vivo* (36).

Os adesivos dentinários são formulações complexas, assim, deve-se considerar os diferentes resultados dos materiais testados a uma série de fatores como: composição, técnica de aplicação, viscosidade do material, estabilidade em meio aquoso, grau de conversão, peso molecular e interações sinérgica ou de antagonismo entre os componentes (8, 9, 10, 34). Esses fatores não são inerentes apenas ao material mas também ao substrato dentinário por meio da espessura e permeabilidade. Na presente pesquisa, a espessura dos discos foi padronizada em 0.5 mm por meio de lixas. A permeabilidade foi mensurada através da condutância hidráulica, e a distribuição dos disco foi realizada de modo que os valores médios da permeabilidade dos discos de dentina em cada grupo fossem o mais próximo possível. Dessa forma, essas variáveis foram minimizadas nos resultados, não se tornando um fator confundidor.

A partir dos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular, foi possível observar uma redução significativa do metabolismo celular de todos os grupos submetidos aos procedimentos adesivos, com exceção de G7. A lesão potencial causada pelos monômeros resinosos e outros componentes dos sistemas adesivos

pode variar em consequência das diferenças na composição química dos materiais e a interação dos seus vários componentes, com a estrutura da dentina, resultando em diferentes respostas do tecido pulpar (36). Isso foi observado neste estudo, uma vez que, a amplitude da redução da viabilidade celular variou de 57.73 a 91.14% em função do material e técnica de aplicação. Esse fato sugere que a intensidade da lesão celular depende da forma de tratamento do substrato dentinário e principalmente dos componentes químicos presentes nos sistemas adesivos.

Os resultados obtidos demonstraram que os sistemas adesivos avaliados liberaram componentes em concentrações capazes de influenciar negativamente a respiração mitocondrial das células pulpares. A hipótese nula testada de que o tipo de sistema adesivo e a técnica de aplicação não influenciariam a viabilidade celular foi rejeitada totalmente. O sistema Scotchbond Universal, empregado na técnica convencional (G5), apresentou maior citotoxicidade com diferença estatística dos outros grupos. Esse adesivo contém novos componentes incorporados aos monômeros e solventes como o silano e os copolímeros à base de ionômero de vidro, que por si só podem modificar o comportamento desse material frente ao substrato dentário além de induzir respostas biológicas não desejadas (2, 3). Adicionalmente, na técnica convencional é empregado o condicionamento ácido total que elimina totalmente a *smear layer*, alargando a entrada dos túbulos dentinários, e, conseqüentemente, aumentando a permeabilidade da dentina, o que eleva o risco de toxicidade. De acordo com a literatura, o condicionamento com ácido fosfórico a 37% em dentes humanos leva a uma maior e mais rápida taxa de difusão dos componentes dos adesivos dentinários (34, 36).

Para os sistemas adesivos universais, a comparação entre as técnicas mostrou que houve diferença estatisticamente significativa apenas para o adesivo Scotchbond Universal, sendo que a técnica autocondicionante apresentou menor citotoxicidade (G4). A técnica autocondicionante permite a manutenção da *smear layer* sobre a superfície dentinária, dessa forma, reduzindo a difusão dos monômeros resinosos nos túbulos dentinários (34, 36, 56). Hashimoto et al. (37) relataram que esses sistemas por promoverem efeitos do condicionamento ácido mais leve mantendo a *smear plug* hibridizada dentro dos túbulos dentinários, reduzem o fluxo de fluido, resultando na vedação superior dos túbulos dentinários. Esse fato ficou comprovado em seu estudo que observou que a quantidade de fluxo de fluidos através da dentina hibridizada foi significativamente maior quando utilizou-

se adesivos que utilizam condicionamento total do que os adesivos autocondicionantes (37).

Por outro lado, para o sistema Peak Universal Bond, ainda que não havendo diferença estatística entre as técnicas autocondicionante (G6) e convencional (G7), essa última resultou em menor citotoxicidade, de forma que não diferiu estatisticamente do grupo controle (G1). Esse resultado provavelmente está associado ao fato desse adesivo apresentar uma técnica de aplicação diferente dos demais, pois no G7 não há aplicação do *primer*, o procedimento consiste apenas na aplicação do ácido fosfórico seguido pelo adesivo (Tabela 2). O *primer* apresenta-se menos viscoso com maior quantidade de monômeros hidrofílicos, tais como HEMA, assim como a presença do ácido carboxílico, componente também que apresenta solubilidade em água. Como o *primer* tem uma velocidade maior de difusão, monômeros não polimerizados podem difundir-se no fluido que preenche os túbulos dentinários durante o tempo em que esse permanece na dentina, antes da polimerização, como um resultado da técnica (36). Dessa forma, atinge o tecido pulpar podendo causar lesão irreversível às células pulpares. Mesmo que o adesivo apresente HEMA na sua composição, sabe-se que a sua concentração é bem menor do que a utilizada no *primer*. Isso poderia explicar o fato de o grupo G6 na qual utilizou-se a técnica autocondicionante produzir uma maior redução do metabolismo celular que o grupo G7 que foi empregada a técnica convencional.

A identificação do tipo de morte (necrose e apoptose) é importante na análise da citotoxicidade dos sistemas adesivos (35), pois os monômeros presentes nesses materiais interferem especificamente nas diversas funções celulares (12). A morte celular por necrose é considerada mais agressiva, uma vez que ocorre o rompimento da membrana celular, causando a exposição de todas as organelas essenciais para a sua sobrevivência, o que pode dar início a resposta inflamatória. Por outro lado, a morte por apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que pode estar presente não só durante o desenvolvimento normal mas também na patologia de algumas enfermidades e agentes tóxicos (4). Evidências atuais sugerem fortemente que o mecanismo por trás dessas respostas celulares específicas é a geração do estresse oxidativo. Tem sido estabelecido que os monômeros resinosos causam um esgotamento da glutathione um antioxidante intracelular (GSH), enquanto, paralelamente, aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (8, 9, 11, 12, 13).

Pesquisas vêm demonstrando que o procedimento adesivo altera o processo biológico normal das células (1, 4, 6), assim, identificar o tipo de morte provocada por esses materiais é de suma importância uma vez que as células que sofrem apoptose não geram resposta inflamatória (51, 52, 53) e as que sofrem necrose estão associadas a uma resposta inflamatória causando lesão aos tecidos circundantes (47, 48, 49). Nessa pesquisa, o tipo de sistema adesivo e a técnica de aplicação interferiram na morte celular por apoptose portanto, a hipótese nula foi totalmente rejeitada. Os resultados mostraram que o grupo G6 (Peak Universal Bond – autocondicionante) produziu a menor taxa de indução de apoptose nas células da polpa. Por outro lado, os grupos G2 e G7, ambos empregados na técnica convencional, resultaram nos maiores valores de apoptose (16,58% e 15,03%), respectivamente. Esses foram estatisticamente diferentes de todos os grupos, incluindo o grupo controle. Os valores de apoptose com o respectivo desvio padrão podem ser observados na Tabela 4 e as imagens representativas dos grupos controle (G1), G2, G6 e G7 encontram-se na Figura 24. Nelas pode-se observar a presença de células viáveis, células em processo de apoptose e células identificadas pelo processo de necrose com emissão de fluorescência azul, verde e vermelho, respectivamente.

Todos os materiais induziram morte celular por necrose, sendo que o grupo G2 apresentou a maior taxa (63,44%), com diferença significativa entre os grupos exceto G4. Para essa análise, a hipótese nula foi parcialmente aceita, uma vez que, apenas o tipo de sistema adesivo (universal x não universal) influenciou na morte celular por necrose. Associa-se esse resultado ao condicionamento ácido total e principalmente à composição e viscosidade do *primer*. Como mencionado anteriormente, esse apresenta na sua composição alta concentração de HEMA, um monômero hidrofílico com baixo peso molecular o que possibilita sua difusão em grandes quantidades pela dentina (35). A análise em MEV confirmou, através do número e características morfológicas das células aderidas ao substrato dentinário, o intenso efeito citotóxico desse sistema. Observou-se ampla área de dentina exposta contendo células com formato arredondado, tamanho reduzido e diminuição do prolongamento citoplasmático (Figura 23-B).

Um fator que pode ter influenciado os resultados obtidos nesse estudo seria o efeito da luz LED utilizada para fotopolimerizar os sistemas adesivos pois, sabe-se que a luz pode causar um efeito estimulador ou inibitório do metabolismo celular

(57). Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo causado pela formação de espécies reativas de oxigênio após a irradiação é o principal responsável pelo efeito positivo ou negativo sobre a atividade celular (58, 59). Em pequenas quantidades, as EROs podem levar a um estímulo das mitocôndrias; entretanto, em quantidade elevada pode lesionar componentes intracelulares (60).

O tipo de morte celular mais prevalente para todos os adesivos estudados foi a necrose. Alguns estudos mostraram que o tipo de morte induzida pelos sistemas adesivos era dose-dependente portanto, percebe-se que quantidades suficientes de monômeros e outros compostos difundiram-se pela dentina causando alterações celulares importantes (42, 45, 55). Li (55) relatou ainda que baixas concentrações de BisGMA induziu apoptose enquanto que em altas concentrações, a necrose ocorreu com maior frequência nas células RAW264.7. Nesse estudo, foi observado que células do grupo controle (G1) morreram por necrose. Isso está associado a própria metodologia empregada, já que o eluato que ficou em contato com as células que foram analisadas pelo sistema de imagem continha, além dos monômeros que se difundiram pela dentina, metabólitos e restos celulares das células que por ventura morreram, e foram analisadas por meio do teste de MTT. Quando a célula morre por necrose, ela libera íons Ca^{2+} e restos celulares que por sua vez podem induzir produção de citocinas inflamatórias, as quais, em grandes quantidades, também podem levar a morte por necrose (35).

Os ensaios de cultura celular fornecem um método conveniente, controlável e reproduzível para avaliar a biocompatibilidade dos materiais (31). No entanto, tem sido sugerido que os materiais restauradores considerados citotóxicos *in vitro* podem não ser necessariamente tóxicos *in vivo*, devido ao envolvimento de outras reações biológicas, tais como as reações inflamatória e imune (41). Esse estudo apresenta uma limitação pois, quando as células da polpa sofrem uma agressão, as reações inflamatória e imune ocorrem concomitantemente, contudo, os estudos *in vitro* não reproduzem as reações de defesa dos tecidos (9). Assim, estudos adicionais deverão ser planejados utilizando modelos animais *in vivo* para apoiar ou refutar os resultados apresentados por pesquisas *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

Todos os sistemas adesivos avaliados apresentaram citotoxicidade às células da polpa, caracterizados por morte e notáveis alterações na morfologia celular. As diferenças na intensidade da lesão celular causada pelos adesivos testados foram dependentes da técnica adesiva e da composição desses materiais. A hipótese nula testada foi aceita parcialmente, uma vez que, o tipo de sistema adesivo e a técnica de aplicação influenciaram a viabilidade e a morte celular por apoptose. Contudo, a análise de morte celular por necrose foi influenciada apenas pelo tipo de sistema adesivo (universal x não universal).

8 REFERÊNCIAS

1. da Silva JM, Rodrigues JR, Camargo CH, Fernandes VV Jr, Hiller KA, Schweikl H, Schmalz G. Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives. *Clin Oral Invest* 2013.
2. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, De Munck J. Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent* 2012; 40(6): 475-84.
3. Perdigão J, Sezinando A, Monteiro PC. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. *Am J Dent* 2012; 25(3): 153-8.
4. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006; 85(10): 870-7.
5. Martins CA, Leyhausen G, Geurtsen W, Volk J. Intracellular glutathione: a main in TEGDMA-induced cytotoxicity? *Dent Mater* 2012; 28(4): 442-8.
6. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998; 41(3): 474-80.
7. Durner J, Wellner P, Hickel R, Reichl FX. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dent Mater* 2012; 28(8): 818-23.
8. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 2008; 12(1): 1-8.
9. Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. *Adv Dent Res* 2011; 23(3): 302-6.
10. Chang MC, Chen LI, Chan CP, Lee JJ, Wang TM, Yang TT, Lin PS, Lin HJ, Chang HH, Jeng JH. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. *Biomaterials* 2010; 31(32): 8164-71.
11. Galler KM, Schweikl H, Hiller K-A, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, Schmalz G. TEGDMA Reduces Mineralization in Dental Pulp Cells. *J Dent Res* 2011; 90(2): 257-62.
12. Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis

- in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials* 2012; 33(21): 5177-86.
13. Cataldi A, Zara S, Rapino M, Patruno A, di Giacomo V. Human gingival fibroblasts stress response to HEMA: A role for protein kinase C α . *J Biomed Mater Res A* 2013; 101(2): 378-84.
 14. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011; 27(1): 17-28.
 15. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003; 28(3): 215-35.
 16. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011; 27(1): 1-16.
 17. Buonocore, M.G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; 36(6): 849-53.
 18. Burke FJT, McCaughey AD. The four generation of dentin bonding. *Am J Dent* 1995; 8(2): 88-92.
 19. Lopes GC, Baratieri LN, Caldeira de Andrade MA, Vieira LC. Dental adhesion: present state of the art and future perspectives. *Quintessence Int* 2002; 33(3): 213-14.
 20. Kanca J. Resin bonding to wet substrate. I Bonding to dentin. *Quintessence Int* 1992; 23(1): 39-41.
 21. Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent* 1998; 26(1): 1-20.
 22. Perdigão J, Baratieri LN, Lopes M. Laboratory evaluation and clinical application of a new one-bottle adhesive. *J Esthet Dent* 1999; 11(1): 23-5.
 23. Finger WJ, Inocue M, Asmussen E. Effect of wettability of adhesive resins on bonding to dentin. *Am J Dent* 1994; 7(1): 35-8.
 24. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHI. Struture evidence of a sealed tissue interface with a total-etch wet-bonding technique in vitro. *J Dent Res* 1994; 73(3): 629-36.
 25. Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. The interactions of adhesion systems with human dentin. *Am J Dent* 1996; 9(4): 167-73.
 26. Carvalho RM, Yoshiyama M, Pashley EL, Pashley DH. In vitro study on the

- dimensional changes of human dentine after desmineralization. *Arch Oral Biol* 1996; 41(4): 369-77.
27. Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. The effects of dentine location and tubule orientation on the bond strengths resin and dentine. *J Dent* 1999; 27(4): 265-74.
 28. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: A systematic review of current clinical trials. *Dent Mater* 2005; 21(9): 864-81.
 29. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials* 2005; 26(9):1035–42.
 30. Chan KM, Tay FR, King NM, Imazato S, Pashley DH. Bonding of mild self-etching primers/adhesives to dentin with thick smear layers. *Am J Dent* 2003;16(5):340–6.
 31. Kusdemir M, Gunal S, Ozer F, Imazato S, Izutani N, Ebisu S, Blatz MB. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dent Mater J* 2011; 30(6): 799-805.
 32. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008; 24(3): 362-71.
 33. Lanza CRM, Júnior LAL, Souza LB, Hebling J, Costa CAS. Inibição do metabolismo de células odontoblastóides induzida por sistemas adesivos autocondicionantes. *Robrac* 2006; 15(40): 23-33.
 34. Poskus LT, Lima RS, Lima IR, Guimarães JG, da Silva EM, Granjeiro JM. Cytotoxicity of current adhesive systems: *in vitro* testing on cell culture of L929 and balb/c 3T3 fibroblasts. *Rev odonto ciênc* 2009; 24(2): 129-34.
 35. Bianchi L, Ribeiro AP, de Oliveira Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013: 1-10.
 36. Porto IC, Oliveira DC, Raele RA, Ribas KH, Montes MA, De Castro CM. Cytotoxicity of current adhesive systems: *In vitro* testing on cell cultures of primary murine macrophages. *Dent Mater* 2011; 27(3): 221-8.
 37. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res*

- 2004; 83(11): 843-8.
38. Costa CAS, do Nascimento AB, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of bonding agent in deep cavities. *Dent Mater* 2002; 18(7): 543-51.
 39. Ceballos L, Camejo DG, Victoria Fuentes M, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Pashley DH. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent* 2003; 31(7): 469-77.
 40. Costa CAS, Hebling J. In vitro evaluation of adhesive systems applied on culture of odontoblast-like cells. *Rev Odontol UNESP* 2006; 35(1): 97-106.
 41. El-kholany NR, Abielhassan MH, Elembaby AE, Maria OM. Apoptotic effect of different self-etch dental adhesives on odontoblasts in cell cultures. *Arch Oral Biol* 2011; 57(6): 775-83.
 42. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater* 2006; 22(12): 1086-92.
 43. Szczepanska J, Poplawski T, Synowiec E, Pawlowska E, Chojnacki J, Blasiak J. 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), a tooth restoration component, exerts its genotoxic effects in human gingival fibroblasts through methacrylic acid, an immediate product of its degradation. *Mol Biol Rep* 2012; 39(2): 1561-74.
 44. Ansteinson V, Kopperud HB, Morisbak E, Samuelsen JT. Cell toxicity of methacrylate monomers-The role of glutathione adduct formation. *J Biomed Mater Res A* 2013; 101(12): 3504-10.
 45. Spagnuolo G, D'Antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2006; 27(9): 1803-9.
 46. Renvoizé C, Biola A, Pallardy M, Bréard J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14(2): 111-20.
 47. Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry* 2005; 70(2): 231-39.
 48. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-Mediated programmed necrosis: A highly regulated way to die. *Cell Cycle* 2007; 6(21): 2612-19.
 49. Kerr JFR, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 1995; 46: 1-27.

50. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10(9): 369-77.
51. Lavin MR. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. *Am J Psychiatry* 1993; 150: 1752-3.
52. Liao X, Tang S, Thrasher JB, Griebeling TL, Li B. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(4): 505-15.
53. Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn JA. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 873-85.
54. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003; 82(8): 592-6.
55. Li YC, Kuan YH, Huang FM, Chang YC. The role of DNA damage and caspase activation in cytotoxicity and genotoxicity of macrophages induced by bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate. *Int Endod J* 2012; 45(6): 499-507.
56. Ceballos, L. Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent*, 2004; 31(1): 469-77.
57. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. *Photochem Photobiol*, 1990;52: 1089-98.
58. Lewis JB, Wataha JC, Messer RL, Caughman GB, Yamamoto T, Hsu SD. Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005;72: 223-9.,
59. Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RL, Hsu SD. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater*, 2005;21: 683-8.
60. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon laser irradiation. *Lasers Surg Med*, 2006; 38: 74–83.

ANEXOS

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Plataforma Brasil http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/visao/pesquisador/g...

principal central de suporte sair

Andressa Fabro - Pesquisador | V2.23
Sua sessão expira em: 30min 55

Cadastros

Você está em: Pesquisador > Geix Pesquisa > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

Dados do Projeto de Pesquisa

Título da Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade transdientária dos sistemas adesivos universais.
 Pesquisador: Andressa Fabro
 Área Temática:
 Versão: 1
 CAAE: 22374413.0.0000.0030
 Submetido em: 10/10/2013
 Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília
 Situação: Aprovado
 Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Documentos Postados do Projeto

Tipo Documento	Situação	Arquivo	Postagem
Parecer Consubstanciado do CEP	A	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_461663.pdf	20/11/2013 12:29:40
Informações Básicas do Projeto	A	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_223744.pdf	10/10/2013 16:48:11
Interface REBEC	A	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	10/10/2013 16:48:11
Outros	A	CV do CBMF.docx	10/10/2013 16:45:27
Vínculo Instituições Participantes	A	CONC_HMAB_13.docx	27/09/2013 09:05:57
Vínculo Instituição Responsável Promotora	A	CONC_UNB_13.docx	27/09/2013 09:03:48
TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	A	TCLE_1.doc	27/09/2013 09:00:30
Projeto Detalhado	A	PROJETO_CEP.docx	27/09/2013 08:59:58
Folha de Rosto	A	FOLHA_DE_ROSTO.jpg	27/09/2013 08:45:37

Listar Todos »

Tramitação:

CEP Trâmite	Situação	Data Trâmite	Parecer	Informações
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Submetido para avaliação do CEP	27/09/2013		
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Rejeição do PP	30/09/2013		Por Favor, Anexar Todos os Curriculum Lattes dos P...Ver mais>>
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Submetido para avaliação do CEP	10/10/2013		
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Aceltação do PP	16/10/2013		
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - CEP/FS-UnB	Parecer liberado	20/11/2013		

Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),
ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).