



Universidade Estadual Paulista – UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara

LUCIANA BIANCHI

***Citotoxicidade direta e transdentinária
de sistemas adesivos com diferentes
graus de hidrofília sobre células
odontoblastóides***

Araraquara • 2011



Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara

LUCIANA BIANCHI

*Citotoxicidade direta e transdentinária de
sistemas adesivos com diferentes graus de
hidrofilia sobre células odontoblastóides*

*Araraquara
2011*



Universidade Estadual Paulista - UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara

LUCIANA BIANCHI

Citotoxicidade direta e transdentinária de sistemas adesivos com diferentes graus de hidrofilia sobre células odontoblastóides

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de concentração Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

*Araraquara
2011*

Bianchi, Luciana.

Citotoxicidade direta e transdentinária de sistemas adesivos com diferentes graus de hidrofília sobre células odontoblastóides / Luciana Bianchi. – Araraquara : [s.n.], 2011.

136 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Adesivos dentinários 2. Etanol 3. Dentina 4. Odontoblastos
5. Citotoxicidade I. Título

LUCIANA BIANCHI

**CITOTOXICIDADE DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DE SISTEMAS
ADESIVOS COM DIFERENTES GRAUS DE HIDROFILIA SOBRE CÉLULAS
ODONTOBLASTÓIDES**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^ª Dr^ª Josimeri Hebling

2º Examinador: Prof^ª Dr^ª Marcela Rocha de Oliveira Carrilho

3º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves de Campos

Araraquara, 19 de dezembro de 2011.

Luciana Bianchi

DADOS
CURRICULARES

Nascimento	04/10/1982, Descalvado, SP
Filiação	José Luiz Bianchi Suzelei Izabel Assoni Bianchi
2002 a 2005	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP - UNICAMP
2009 a 2011	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - UNESP

"Desejo primeiro que você ame, e que amando, também seja amado.
E que se não for, seja breve em esquecer. E que esquecendo, não guarde mágoa.

Desejo também que tenha amigos, Que mesmo maus e inconsequentes,
Sejam corajosos e fiéis, e que pelo menos num deles
Você possa confiar sem duvidar. E porque a vida é assim,
desejo ainda que você tenha inimigos.

Nem muitos, nem poucos, mas na medida exata para que, algumas vezes,
Você se interpele a respeito de suas próprias certezas. E que entre eles, haja pelo
menos um que seja justo, para que você não se sinta demasiado seguro.

Desejo ainda que você seja tolerante, não com os que erram pouco, porque isso é
fácil, mas com os que erram muito e irremediavelmente,
e que fazendo bom uso dessa tolerância, você sirva de exemplo aos outros.

Desejo que você, sendo jovem, não amadureça depressa demais,
E que sendo maduro, não insista em rejuvenescer
E que sendo velho, não se dedique ao desespero.
Porque cada idade tem o seu prazer e a sua dor e
É preciso deixar que eles escorram por entre nós.

Desejo também que você plante uma semente,
Por mais minúscula que seja, e acompanhe o seu crescimento,
Para que você saiba de quantas muitas vidas é feita uma árvore.

Desejo por fim que você sendo homem, tenha uma boa mulher,
e que sendo mulher, tenha um bom homem
e que se amem hoje, amanhã e nos dias seguintes,
e quando estiverem exaustos e sorridentes,
Ainda haja amor para recomeçar.
E se tudo isso acontecer, não tenho mais nada a te desejar ".

Victor Hugo (Desejo)

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS



DEDICO ESTE TRABALHO...

Aos meus pais, Zé Luiz e Suze,

Obrigada por todo carinho e amor incondicional, vocês me deram a vida e me ensinaram a ter responsabilidade, caráter e honestidade, mostraram-me o caminho certo quando eu me sentia perdida, sempre com muito afeto e dedicação, renunciaram aos próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pela longa espera e compreensão de minhas ausências. “Eu tenho tanto pra lhes falar, mas com palavras não sei dizer, e não há nada pra comparar, para poder lhes explicar, nunca se esqueçam, nenhum segundo, que eu tenho o amor maior do mundo, como é grande o meu amor por vocês”.

Aos meus irmãos, Breno e Gabriela,

Breno, obrigada por todas as lembranças boas da minha infância, pela cumplicidade, brincadeiras e aventuras, por me ensinar a amar e proteger quem se ama, por me ajudar a compreender e aceitar as diferenças. Eu sinto muito a sua falta, do tempo em que éramos crianças e estávamos sempre juntos, mas a distância não diminui o verdadeiro amor, o amor fraterno. Eu te amo muito, e incondicionalmente, você pode contar comigo sempre!

Bibi, minha irmãzinha mais nova, obrigada pela força e apoio nos momentos em que eu tinha certeza que tudo daria errado, obrigada por vibrar comigo nas minhas realizações, e por se orgulhar tanto de mim. Esse orgulho é que me impulsiona a ir adiante, penso sempre em ser um bom exemplo para você...eu te amo!

A minha Vó Lucila,

Obrigada por toda a preocupação, carinho e amor infinito, por todas as orações, terços e velas acesas, por todos os colos, cafunés, risadas e conversas, por todos os sabores e aromas sentidos e receitas aprendidas, por todos os passeios na praça regados a milk-shake e raspadinha, por estar comigo nos fins de semana e no meu pensamento durante a semana, por todas as coisas boas que sentimos e vivemos juntas..Obrigada simplesmente por ser sempre a minha vó Cila!

A Deus,

Por sempre guiar meus passos, iluminando meus pensamentos e minhas ações nos momentos mais difíceis, e por me dar sempre força para continuar lutando...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...

A Prof^a Dr^a Josimeri Hebling,

Há pessoas que nascem com o dom de ensinar tudo o que sabem, sendo considerados ótimos professores. Outras tem a sorte de possuir a inteligência, curiosidade e perspicácia, buscando incessantemente o conhecimento, tornando-se assim pesquisadores respeitados e renomados. Com toda a delicadeza, amor e dedicação a senhora conseguiu unir Professora e Pesquisadora com muito brilhantismo, sendo um exemplo, não somente como profissional, mas também como pessoa. Muito obrigada por acreditar em mim desde o início, oferecendo-me a oportunidade de aprender e crescer como ser humano e na profissão que escolhi. Obrigada por me mostrar a beleza da carreira acadêmica, que até então eu não conhecia, e acima de tudo por estar sempre presente e ser muito mais que uma orientadora!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa,

Por ser sempre exemplo de dedicação, respeito e ética. Eu o admiro muito, e agradeço por poder fazer parte desse grupo de pesquisa, que hoje é considerado referência mundial, pois todos que lá estão realmente seguem os seus preceitos.

Ao meu namorado Erik,

Por todo amor, carinho, apoio e compreensão das minhas ausências. Obrigada por segurar minha mão nas horas de desespero, ansiedade e medo, por me abraçar e abrir o sorriso mais lindo que eu já vi na conquista de minhas vitórias. Obrigada por me amar de um jeito puro e pleno. Quero estar com você, e continuar sendo feliz junto com você, por todos os dias de minha vida. Te amo!

A Ana Paula Dias Ribeiro (Aninha),

Que esteve comigo nas horas em que chorei e nas horas que sorri, nas horas que me lamentei e nas horas em que, de uma forma ou de outra, demonstrei total alegria, queria agradecer pelo sorriso diário, pelos ensinamentos e pelas palavras de incentivo, que me fizeram seguir em frente, sempre!

A Fernanda Basso,

Obrigada por tudo que me ensinou, pela sua alegria de viver, que me anima e me faz rir, mesmo com tantas preocupações. Obrigada pelos conselhos e dicas, e por tornar-se uma amiga de verdade!

Aos meus colegas do laboratório,

Pela convivência diária, troca de conhecimentos, e ajuda quando eu precisei.

A minha prima Bruna,

Minha irmãzinha de coração, por estar ao meu lado em todos os momentos da vida, compartilhando emoções, alegrias e tristezas. Vou continuar cuidando e protegendo você, fazendo de tudo o que estiver ao meu alcance pra te ver feliz! Amo você!

As minhas tias Arlete, Ana e Cidinha,

Por estarem sempre presentes, torcendo e rezando por mim, trazendo-me palavras de conforto. Obrigada por toda dedicação e orgulho. Considero-me uma pessoa abençoada por tantas “mães” que Deus colocou no meu caminho!

Aos meus tios Nilson, Edson e Mimi,

Pela proteção e carinho, pelo apoio e torcida, por todo amor dedicado a mim, desde os meus primeiros passos, até a realização dos meus sonhos!

As minhas primas Gabriela e Graziela,

Por todas as palavras de incentivo e pensamentos positivos para que tudo desse certo comigo. Vocês são exemplos de profissionais dedicadas e que amam o que fazem. Obrigada por tudo que fizeram por mim, e espero retribuir da melhor maneira que puder, cuidando muito bem do Léozinho, do Guilherme, e de todos os outros priminhos que ainda estão por vir!

As minhas amigas Milena, Vanessa, Camila, Maria Júlia e Ciça,

Agradeço por todas as histórias divertidas, pelos momentos vividos, pela amizade e compreensão. Eu sei que me ausentei muito nesses dois anos, mas foi em busca da realização de um sonho, e vocês com toda certeza fazem parte dele, porque estiveram comigo no meu pensamento e no meu coração.

As minhas amigas Izabella, Flávia, Maria, Jéssica e Natália,

Minhas amigas dos tempos de faculdade, que tornaram-se amigas para a vida inteira! Obrigada pelo companheirismo, apoio e carinho. Somos uma mistura de

personalidades bem diferentes, por isso nos completamos, solidificando cada vez mais a nossa amizade com o passar do tempo. Espero que o teatro do último ano da faculdade torne-se realidade, todas nós, já velhinhas, sentadas num banco de praça, relembando todos os momentos felizes que passamos juntas!

Ao meu amigo Adriano,

Que foi o primeiro a me incentivar, abrindo as portas para um novo caminho, dando aquele “empurrãozinho” que faltava. Você me encorajou a correr atrás desse sonho que eu já havia desistido. Por isso hoje, eu só tenho que lhe agradecer, muito obrigada por acreditar em mim!

A todos os meus tios e tias, primos e primas,

A todos os Assoni's e Bianchi's que de alguma maneira fizeram parte da minha história, e que guardo na minha memória e no meu coração com muito carinho. Eu tenho muito orgulho de fazer parte dessas duas famílias, as quais devo todas as alegrias vividas até hoje!

A todas as pessoas que amo e que infelizmente não podem me abraçar e participar desse momento especial ao meu lado. Eu penso que, por serem pessoas tão boas, Deus quis vocês ao lado Dele, e me privou precocemente de suas presenças, mas eu sei que estarão, em algum lugar, muito felizes por mim, abençoando-me e guiando os meus caminhos.

A minha sogra Cleonice,

Que me acolheu no seu coração como uma filha, e por ser sempre uma pessoa doce e sensata, fonte de carinho e conforto quando eu estava longe da minha família.

A Profª Drª Marcela Carrilho,

Por ser fonte de inspiração para todas as pessoas que estão iniciando na carreira acadêmica como eu. Obrigada pela convivência sempre agradável, pela oportunidade de aprender sempre mais, pela rica colaboração nesse trabalho, sendo uma honra ter a sua participação na minha formação profissional.

As minhas colegas da turma de mestrado,

Ana Paula (Pops), Thalita, Amanda, Beatriz, Camila, Margareth e Natália. Obrigada pelo convívio, e por compartilhar todos os momentos de ansiedade e receio, como também os momentos de descontração e alegria. Eu sou muito feliz por fazer parte do melhor cacho de uva da faculdade!

AGRADECIMENTOS...

A Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald e Vice Reitor Prof. Dr. Júlio César Durigan.

A Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pelo digníssimo Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e pela Vice Diretora Prof^a Dr^a Andréia Affonso Barretto Montandon.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento Prof^a Dr^a Ângela Cristina Cilense Zuanon e Vice Chefe Lídia Parsekian Martins.

Aos Professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia De Araraquara – FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos – Pinto e Rita de Cássia Loyola Cordeiro pela convivência diária e os ensinamentos adquiridos.

A Coordenação de Pós – Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pelos Professores Dr^a. Josimeri Hebling e Dr. Edson Alves de Campos.

Aos funcionários da Secretaria de Pós – Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Mara, Rosângela, Flávia e Alexandre pela atenção que sempre nos dispensaram em todos os momentos.

A Prof^a Dr^a Elisa, pela amizade, atenção e carinho. Pelo exemplo de dedicação, simplicidade e paciência.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudos (processo 2009/06446-5).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro concedido por meio do Edital Universal (processo 473453/2009-6).

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do FCM/IFSC/ da USP de São Carlos, pelo auxílio com a análise das amostras deste trabalho.

Ao Laboratório do Programa de Mestrado em Farmácia na Área de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN, representado pela Profa. Dra. Regina Mara Silva Pereira, pela orientação e ajudas essenciais na análise do grau de conversão dos sistemas adesivos experimentais utilizados na presente pesquisa.

Ao Laboratório de Dentística da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP – UNICAMP, representado pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar, responsável

pelo aparelho FTIR, no qual foram realizadas as análises do grau de conversão monomérica dos sistemas adesivos experimentais utilizados na presente dissertação.

Ao Laboratório de Micologia Clínica, do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCF – UNESP, representado pela Prof^a Dr^a Maria José Soares Mendes Giannini, e em especial a aluna de doutorado Julhiany de Fatima da Silva, por todo auxílio com a análise das amostras de citometria de fluxo, e por ser sempre uma pessoa delicada e prestativa.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Tânia, Odete, Dulce, Soninha, Pedrinho e Totó pelo convívio amigável e ajuda em hora oportuna, bem como a Cris e Márcia por fornecerem um ambiente de trabalho agradável.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Maria Helena, Marley, Cristina, Ceres, Maria, Sílvia, Odete, Eliane, Inês e Adriano. Muito obrigada pela simpatia, carinho, atenção e ajuda constante.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os pacientes que voluntariamente doaram seus dentes para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO SUMÁRIO SUMÁRIO



Sumário

RESUMO	20
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	26
PROPOSIÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODO	31
CAPÍTULO 1	32
<i>Citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofilia sobre células odontoblastóides</i>	33
CAPÍTULO 2	67
<i>Citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofilia aplicados sobre a dentina impregnada por etanol</i>	68
DISCUSSÃO GERAL	104
CONCLUSÃO GERAL	109
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE	119
<i>Ilustrações da metodologia do Capítulo 1</i>	120
<i>Ilustrações da metodologia do Capítulo 2</i>	122
ANEXOS	125
<i>Certificado aprovação CEP</i>	126
<i>Normas do periódico Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials</i>	127
<i>Normas do periódico Dental Materials</i>	131

RESUMO

RESUMIO RESUMIO RESUMIO



Bianchi L. Citotoxicidade direta e transdentinária de sistemas adesivos com diferentes graus de hidrofília sobre células odontoblastóides [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

RESUMO

O objetivo geral desse trabalho, dividido em dois experimentos (capítulos 1 e 2), foi avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais (SAEs), com diferentes graus de hidrofília, e do etanol como solução de solvatação da dentina, sobre células odontoblastóides. No capítulo 1, discos de papel filtro esterilizados foram impregnados com 10 µL de cada SAE (n=22): R1, R2, R3, R4 e R5 (em ordem crescente de hidrofília), seguido de fotoativação. Os discos foram individualmente imersos em meio de cultura DMEM para obtenção de extratos (DMEM + componentes liberados dos SAEs), os quais foram posteriormente aplicados sobre células MDPC-23 em cultura. Discos não impregnados (R0) serviram como controle. Foram avaliados o metabolismo celular (teste de MTT), a expressão de proteína total (PT) e a atividade de fosfatase alcalina (FA), além do tipo de morte celular (citometria de fluxo) e grau de conversão monomérica (FTIR) dos SAEs. Os dados de cada variável resposta do estudo foram analisados por testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Considerando R0 como 100%, foi observada redução do metabolismo celular de 36,4%, 3,1%, 0,2%, 21,5% e 65,7%, respectivamente para R1, R2, R3, R4 e R5. Apenas R1 e R5 diferiram estatisticamente do controle. Para PT, R1, R4 e R5 tiveram expressão estatisticamente inferior ao controle, enquanto que a atividade de FA foi significativamente reduzida por R1 e R5. Esses mesmos SAEs juntamente com R4 induziram as maiores porcentagens de morte celular por necrose, predominante para todos os SAEs. Maior porcentagem de conversão monomérica foi registrada

em função do aumento do grau de hidrofília. Foi possível concluir, de acordo com as condições experimentais, que os SAEs R2 e R3 foram não tóxicos as células MDPC-23. Dessa forma, o grau de hidrofília ou de conversão monomérica do SAE não determinou, isoladamente, seu efeito citotóxico. No capítulo 2, discos de dentina com 0,4 mm de espessura foram preparados, divididos em 10 grupos após determinação da condutância hidráulica e montados em câmaras pulpares in vitro. Sobre a superfície pulpar foram plantadas células MDPC-23. Sobre o lado oclusal, após condicionamento com ácido fosfórico e impregnação da dentina desmineralizada com água ou etanol, foi aplicado um dos quatro SAEs (R2, R3, R4 ou R5), sendo R0 o grupo controle. Oito discos foram utilizados para quantificação da enzima SDH por meio do teste de MTT, enquanto dois foram utilizados para a análise da morfologia celular em MEV. Adicionalmente, o tipo de morte celular (apoptose ou necrose) foi identificado por citometria de fluxo e o grau de conversão monomérica foi determinado (FTIR) após 10 ou 20 s de fotoativação. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados ($\alpha=0,05$). A impregnação da dentina com etanol aumentou a porcentagem de morte celular por necrose para R3, R4 e R5 em comparação a água, a despeito do fato de que R3 e R4 induziram a uma maior produção de SDH. A fotoativação por 20 s melhorou significativamente o grau de conversão monomérica de todos os SAEs comparado a 10 s. Em conclusão, com exceção de R2, a utilização de etanol favoreceu a citotoxicidade dos SAEs, expressa por indução de morte celular por necrose.

PALAVRAS-CHAVE: adesivos dentinários, citotoxicidade, etanol, dentina, células odontoblastóides

Bianchi L. Direct and transdental cytotoxicity of adhesive systems with different degrees of hydrophilicity on odontoblast-like cells [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

ABSTRACT

The overall aim of this study, divided into two experiments, was to evaluate the cytotoxicity of experimental adhesive systems (EAS) with different hydrophilicity, and ethanol as a dentin solvation solution, on odontoblast-like cells. In the first experiment, sterilized filter paper discs were impregnated with 10 μ L of each EAS: R1, R2, R3, R4 and R5 (in increasing rank of hydrophilicity), followed by light activation. The paper discs were individually immersed in DMEM culture medium for obtaining the extracts (DMEM + released components of EAS), which were applied on MDPC-23 cells in culture. Non-impregnated paper discs (R0) were used as control. Cell metabolism (MTT assay), total protein expression (TP) and alkaline phosphatase activity (ALP) were assessed, in addition to the type of cell death (flow cytometry) and the degree of monomer conversion (FTIR). Data for each response variable were submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$). Compared to the control (100%), cell metabolism was decreased by 36.4%, 3.1%, 0.2%, 21.5% and 65.7% for R1, R2, R3, R4 and R5, respectively. However, only R1 and R5 differed from the control. R1, R4 and R5 decreased the expression of TP compared to the control, whereas only R1 and R5 significantly reduced the activity of ALP. The later EAS plus R4 caused the highest percentages of cell death by necrosis. A higher percentage of monomer conversion was detected as a function of the hydrophilicity. According to the experimental conditions, it could be concluded that R2 and R3 were not toxic to the MDPC-23. Thus, hydrophilicity or degree of conversion did not respond, exclusively, for

the cytophatic effects of the EAS. In the second experiment, 0.4 mm-thick dentin discs were prepared and assigned to 10 groups after assessment of the hydraulic conductance. After fitted into in vitro pulp chambers, MDPC-23 cells were seeded on the pulp side of the dentin discs while the EAS (R2, R3, R4 e R5) were applied on the occlusal side after phosphoric acid conditioning and solvation of the demineralized dentin with water or ethanol. R0 represented the control where no EAS was applied. Eight discs were used to quantify SDH enzyme production by MTT test, while two discs were used for the analysis of cell morphology by SEM. Cell death (necrosis/apoptosis) was identified by flow cytometry and the degree of monomer conversion was determined (FTIR) after 10 or 20 s of photo-activation. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for statistical analysis of the data ($\alpha=0.05$). The dentin impregnation with ethanol increased the percentage of cell death by necrosis for R3, R4 and R5 when compared to water, despite the fact the R3 and R4 increased the production of SDH. Photo-activation for 20 s significantly improved the degree of conversion of all EAS when compared to 10 s. As an overall conclusion, except for R2, the impregnation of dentin with ethanol increased the cytotoxicity of the EAS through the induction of cell death by necrosis.

KEYWORDS: dentin adhesives, cytotoxicity, ethanol, dentin, odontoblast-like cells

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO INTRODUÇÃO INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO GERAL

A adesão de materiais poliméricos ao substrato dentinário pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o tipo e composição dos sistemas adesivos, sua técnica de aplicação e as características intrínsecas desse tecido, as quais determinam sua heterogeneidade. Por essa razão, a adesão a dentina não é considerada tão segura e previsível quanto a adesão ao esmalte^{1,22,46} e, portanto, a produção de uma união estável ao longo do tempo ainda é um desafio a ser superado.

Deterioração da união resina-dentina tem sido demonstrada em vários estudos^{30,32,34,45}. Entretanto, o exato mecanismo de degradação dos componentes que formam essa união ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que esse fenômeno envolve ambos os substratos, resina e dentina, os quais são negativamente afetados pela ação da água (degradação hidrolítica) e de enzimas salivares, bacterianas⁵⁴ e da própria dentina (degradação enzimática)^{11,14,34,43}. Embora o processo de degradação possa ser dividido em três estágios, (1) plastificação do polímero pela água, (2) lixiviação de monômeros e/ou oligômeros da camada híbrida ou do adesivo, e (3) degradação hidrolítica e enzimática da matriz dentinária⁴⁵, ainda não existe consenso sobre qual componente da interface é mais susceptível a esses eventos¹².

Ambas as formas de degradação, hidrolítica e enzimática, são indesejáveis e podem culminar na falência da funcionalidade da união resina-dentina. Dentre os componentes dessa união, fibrilas de colágeno expostas devido a infiltração incompleta da dentina desmineralizada^{3,7,17,23} ou devido a degradação hidrolítica, em longo prazo, do componente polimérico^{31-32,42} e lixiviação dos monômeros residuais e polímeros de baixo peso molecular,

são susceptíveis as duas formas de degradação; enquanto que o componente polimérico é susceptível apenas a degradação hidrolítica.

Na tentativa de reduzir os efeitos deletérios causados pela água sobre o componente polimérico que constitui a união resina-dentina, tem sido investigada a utilização de etanol como solução de solvatação da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico^{6,52}, visando sua infiltração por monômeros mais hidrófobos, e, conseqüentemente, mais resistentes a degradação hidrolítica^{8,35,44}. Isso torna-se possível devido a mudança da característica hidrófila da dentina condicionada para uma característica mais hidrófoba, embora temporariamente, devido a substituição da água pelo etanol⁵².

Embora a proposta de impregnação da dentina com uma solução alcoólica favoreça a infiltração monomérica, quantitativa e qualitativamente, assim como a estabilidade longitudinal das interfaces produzidas^{7,10,32}, nenhuma informação existe na literatura quanto a possibilidade dessa técnica favorecer também os efeitos citopáticos desses componentes monoméricos, uma vez que tem sido demonstrado que monômeros resinosos são capazes de se difundir pela dentina e alcançar o tecido pulpar subjacente em concentrações suficientes para eliciar reações adversas^{18,21,33,39,57}. Adicionalmente, também tem sido demonstrado que esses componentes são capazes de induzir a apoptose *in vitro*^{19,41,49}, entre outros eventos celulares e biológicos indesejáveis, tais como interferência na síntese de ATP e no processo de remineralização, reações imunológicas e alterações genéticas^{28,38}.

Monômeros de elevado peso molecular como BisGMA e UDMA, categorizados como hidrófobos, apresentam efeitos citopáticos superiores aos observados por monômeros hidrófilos como HEMA, por exemplo, uma vez que conseguem, entre outras reações

indesejáveis, inibir proliferação celular e alterar o processo de mineralização, influenciando negativamente o processo de reparo do tecido agredido. Esses efeitos ocorrem de um modo mais intenso quando são comparados com as sequelas deixadas pela ação de monômeros hidrófilos^{5,53}.

A avaliação da citotoxicidade causada por materiais odontológicos é de suma importância, pois pode nortear o desenvolvimento de procedimentos e materiais mais seguros aos tecidos bucais⁴¹. Especificamente para sistemas adesivos, diversos fatores que incluem viscosidade, grau de conversão monomérica, pH e grau de hidrofília influenciam na sua toxicidade^{2,9,26,50,58}, sendo que esta última característica afeta diretamente a capacidade de monômeros infiltrarem um substrato úmido como a dentina^{10,36}. Dessa forma, a justificativa desse estudo baseia-se na hipótese de que o favorecimento da infiltração monomérica da dentina em função de sua solvatação com etanol possa, em contrapartida, favorecer também o efeito citopático de sistemas adesivos.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO PROPOSIÇÃO PROPOSIÇÃO



PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais, com diferentes graus de hidrofília, e da solução de solvatação da dentina, sobre células odontoblastóides por contato direto e indireto.

PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

CAPÍTULO 1

CITOTOXICIDADE DE SISTEMAS ADESIVOS EXPERIMENTAIS COM DIFERENTES GRAUS DE HIDROFILIA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES

Avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais, com diferentes graus de hidrofília, sobre células da linhagem odontoblástica MDPC-23, por meio de contato direto.

CAPÍTULO 2

CITOTOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DE SISTEMAS ADESIVOS EXPERIMENTAIS COM DIFERENTES GRAUS DE HIDROFILIA APLICADOS SOBRE A DENTINA IMPREGNADA POR ETANOL

Avaliar a citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos experimentais (SAEs) com diferentes graus de hidrofília e da solução de solvatação da dentina sobre células da linhagem odontoblástica (MDPC-23).

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO



CAPÍTULO 1

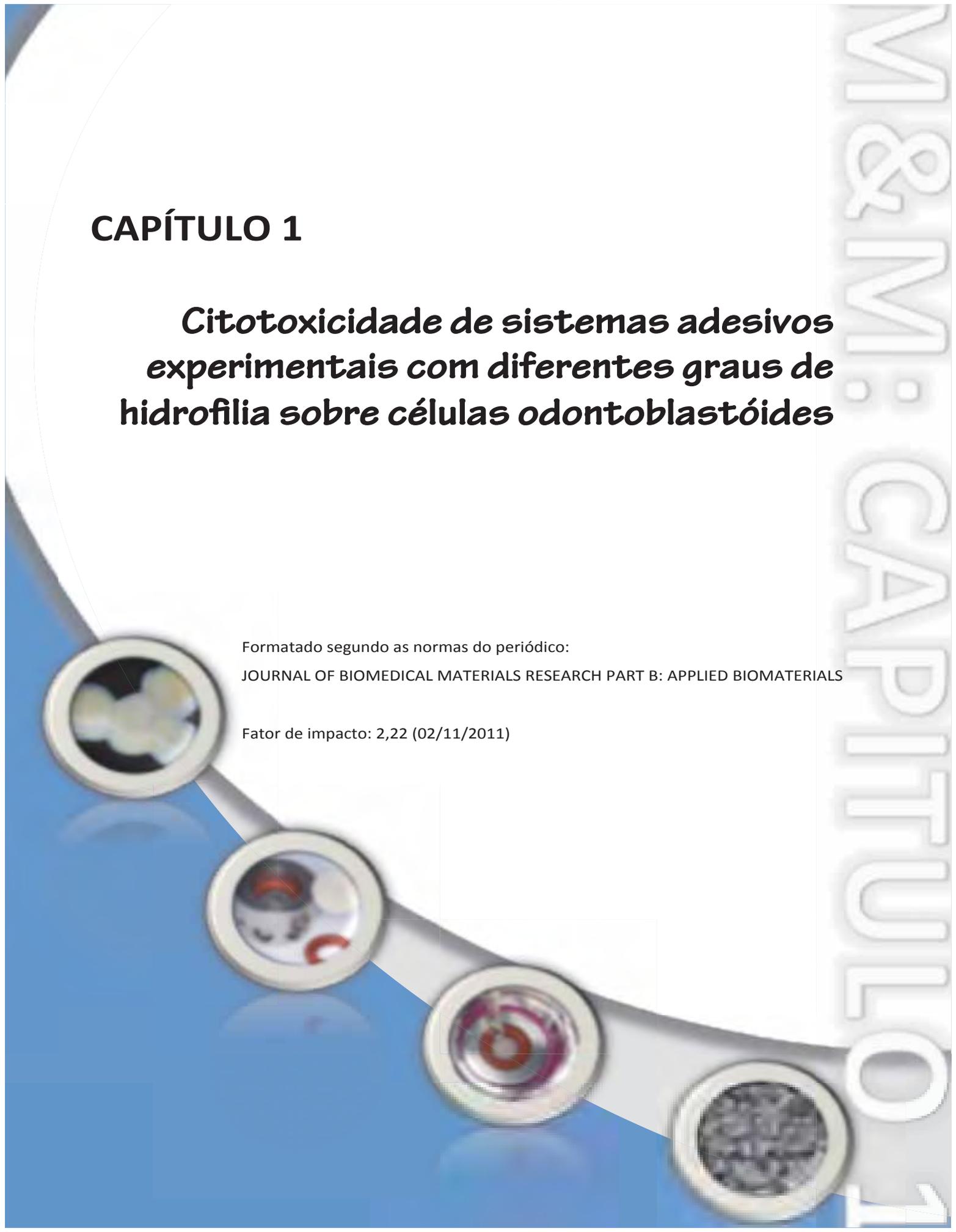
Citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofília sobre células odontoblastóides

Formatado segundo as normas do periódico:

JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B: APPLIED BIOMATERIALS

Fator de impacto: 2,22 (02/11/2011)

M&M: CAPITULO 1



Citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofilia sobre células odontoblastóides

Luciana Bianchi¹

Ana Paula Dias Ribeiro²

Marcela Rocha de Oliveira Carrilho³

Carlos Alberto de Souza Costa⁴

Josimeri Hebling⁵

1 – Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

2 – Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

3 – Departamento de Biomateriais, Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN, São Paulo, São Paulo, Brasil.

4 – Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

5 – Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente:

Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara

Rua Humaitá, 1680 – Centro 14801-903

Araraquara – São Paulo – Brasil Fone: +55 (16) 3301-6334

jhebling@foar.unesp.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos experimentais (SAEs), com diferentes graus de hidrofilia, sobre células odontoblastóides. Discos de papel (n=132) foram impregnados com 10 µL de cada SAE: R1, R2, R3, R4 e R5 (em ordem crescente de hidrofilia), seguido de fotoativação por 10s. Os discos foram individualmente imersos por 24h em DMEM para obtenção de extratos, os quais foram aplicados sobre células MDPC-23. Nenhum material foi aplicado nos discos utilizados como controle (R0). Foram avaliados metabolismo celular (teste de MTT), produção de proteína total (PT), atividade de fosfatase alcalina (FA), tipo de morte celular, além do grau de conversão monomérica (FTIR). Os dados de cada variável resposta foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Considerando R0 como 100% de metabolismo celular, foi observado que R1, R2, R3, R4 e R5 reduziram o metabolismo em 36,4%, 3,1%, 0,2%, 21,5% e 65,7%, respectivamente. Apenas R1 e R5 diferiram do controle. Para PT, R1, R4 e R5 tiveram produção inferior ao controle enquanto que FA foi significativamente reduzida por R1 e R5. Morte celular por necrose foi predominante para todos os SAEs, embora apenas R1, R4 e R5 tenham diferido do controle. Morte por apoptose diferente do controle foi observada apenas para R5. O menor grau de conversão monomérica (ca. 37%) foi registrado para R1, enquanto que os maiores valores foram observados para R4 e R5 (ca. 56%). Foi possível concluir que os SAEs R2 e R3 foram não tóxicos para as células MDPC-23. Assim, o grau de hidrofilia ou de conversão monomérica dos sistemas adesivos não determinou, isoladamente, seu efeito citopático.

Palavras-chave: hidrofilia, adesivos dentinários, citotoxicidade, células odontoblastóides

INTRODUÇÃO

Sistemas adesivos são constituídos principalmente por monômeros resinosos. Tem sido demonstrado que esses monômeros são citotóxicos e moduladores de funções celulares¹. TEGDMA, HEMA, BisGMA e UDMA, comumente utilizados na composição de sistemas adesivos, apresentam comprovada citotoxicidade tempo e concentração dependentes, investigada em estudos *in vivo* e *in vitro*²⁻³, quando aplicados em cavidades profundas ou em contato direto com o tecido pulpar. Esses monômeros podem causar distúrbios em funções celulares básicas como proliferação, atividade enzimática e respiração mitocondrial, além induzir alterações morfológicas e de integridade da membrana⁴. As vias de sinalização da resposta imune, homeostase e reparo tecidual também são afetadas, levando a possíveis efeitos mutagênicos⁵.

A toxicidade de sistemas adesivos depende de diversos fatores, como viscosidade, grau de conversão monomérica, pH e grau de hidrofília⁶⁻⁹. Este último está diretamente relacionado a capacidade de componentes desses sistemas de infiltrar a dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico, uma vez que este tecido deve ser mantido úmido para garantir que os espaços interfibrilares permaneçam abertos¹⁰.

Alguns sistemas adesivos tem recebido críticas por serem muito hidrófilos, especialmente os pertencentes ao grupo autocondicionante simplificado. Esses adesivos apresentam elevadas concentrações de HEMA e TEGDMA, além de água como solvente¹¹. Essas características fazem com que esses materiais formem membranas semi-permeáveis, inadequadas para o selamento hermético da dentina intrinsecamente úmida¹²⁻¹³, além de interferir negativamente no grau de conversão monomérica¹⁴. A passagem de água através dessa membrana de adesivo reduz sua rigidez, favorece sua degradação e prejudica a longevidade da união resina-dentina¹⁵⁻¹⁶.

Na tentativa de reduzir ou eliminar o efeito negativo da degradação hidrolítica desses sistemas adesivos, estudos têm avaliado técnicas e protocolos adesivos com a finalidade de favorecer a infiltração dentinária por sistemas adesivos que contém maiores porcentagens ou quase que exclusivamente monômeros hidrófobos¹⁷⁻¹⁸, reduzindo dessa forma a sorção de água por esses sistemas, assim como a permeabilidade da camada de adesivo que sela a dentina.

A infiltração da dentina por adesivos mais hidrófobos tem sido possível graças a técnica denominada *ethanol-wet bonding*. Essa técnica foi descrita pela primeira vez por Becker *et al.*¹⁹ (2007), e tem sido efetiva em tornar a união resina-dentina mais resistente a degradação hidrolítica, e, portanto, mais estável longitudinalmente²⁰. Entretanto, os prováveis efeitos biológicos causados ao tecido pulpar pela maior e mais profunda infiltração de monômeros hidrófobos de alto peso molecular, como o BisGMA, BisEMA e UDMA, no tecido dentinário, não foram ainda investigados.

Previamente a utilização de modelos animais e dentes humanos, são eticamente indicados modelos experimentais *in vitro*, como a cultura de células, a fim de avaliar a toxicidade desses agentes. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade de adesivos experimentais, com diferentes graus de hidrofilia, sobre células odontoblastóides MDPC-23.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo das células odontoblastóides MDPC-23

Células imortalizadas da linhagem MDPC-23 (*Mouse Dental Papilla Cells*) 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 UI/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. Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO DO BRASIL Ind. Com. de Equipam. Ltda, Campinas, SP, Brasil).

Sistemas adesivos experimentais (SAEs)

Foram utilizados cinco adesivos experimentais com conhecido grau de hidrofilia, em ordem crescente: R1, R2, R3, R4 e R5. Os adesivos R1 e R2 são similares ao componente hidrófobo não solvatado utilizado em sistemas adesivos convencionais de 3 passos ou em sistemas autocondicionantes de 2 passos. R3 representa a composição típica de um sistema adesivo convencional de 2 passos e R4 e R5 contém derivados dos ácidos carboxílico e fosfórico, respectivamente, representando sistemas adesivos autocondicionantes simplificados²¹. A composição dos adesivos experimentais, seu grau de hidrofilia (parâmetro de solubilidade Hoy) e pH estão apresentados na Tabela 1.

Discos de papel filtro esterilizados, com 5 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura, foram impregnados com 10 µL de cada sistema adesivo experimental (n=22) em análise e fotoativados por dez segundos por meio de um aparelho de luz halógena (Optilux 500, Kerr Company, Orange, CA, EUA), previamente avaliado quanto a intensidade de luz emitida com um radiômetro (510±10 mW/cm²). Nenhum material foi aplicado nos discos utilizados para o grupo

controle (R0, n=22). Em seguida, os discos foram posicionados na base de uma placa de acrílico de 24 compartimentos individualizados (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) e foram cobertos com 1 mL de meio de cultura DMEM não suplementado com soro fetal bovino. A placa foi mantida em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C por 24 horas. Decorrido este período, o meio de cultura acrescido dos componentes lixiviados dos adesivos (extrato) foi coletado e colocado em contato com as células MDPC-23, as quais foram semeadas na base de cada well de placas com 24 compartimentos (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), na concentração de 3×10^4 células/cm². A placa foi mantida em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C por mais 24 horas.

Oito amostras de cada grupo foram utilizadas para a quantificação da enzima desidrogenase succínica (SDH) por meio do teste de Metiltetrazolium (MTT) (n=8), sendo o mesmo número de espécimes utilizados para a análise da atividade de fosfatase alcalina (FA) e produção de proteínas totais (PT) (n=8). Dois espécimes foram utilizados para a análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n=2), e os quatro espécimes remanescentes foram utilizados para identificação do tipo de morte celular (n=4).

Análise do Metabolismo Celular (Teste MTT)

O metabolismo celular foi representado pela respiração mitocondrial, a qual é determinada pela produção da enzima desidrogenase succínica (SDH), detectada pelo teste de Metiltetrazolium (MTT). Após 24 horas de contato das células MDPC-23 com os extratos, os mesmos foram aspirados e as células lavadas gentilmente com PBS (solução salina fosfatada tamponada). Em seguida, foram colocados 900 µL de DMEM, ao qual foram adicionados 100 µL

de solução MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), em uma concentração de 5 mg/mL de PBS. As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 600 µL da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional a absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China).

Para a padronização da leitura, os três primeiros compartimentos da placa foram preenchidos com 100 µL da solução de isopropanol acidificada com HCl a 0,04 N para se determinar o valor correspondente a passagem total da luz, ou seja, valor máximo para a redução do metabolismo celular. A média das três alíquotas de cada compartimento foi computada e utilizada na análise estatística.

Quantificação da Produção de Proteína Total (PT)

A quantificação de proteína total produzida pelas células, segundo protocolo de Read e Northcote²² (1981), foi realizada simultaneamente com o teste de MTT, 24 horas após o contato das células com os extratos. O meio de cultura foi aspirado e as células lavadas três vezes com 1 mL de PBS a temperatura de 37°C. Após isso, 1 mL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EUA) foi colocado em cada compartimento e mantido por 40 minutos a temperatura ambiente para provocar a lise das células. As amostras foram então homogeneizadas e uma alíquota de 1 mL de cada compartimento foi transferida para um tubo

Falcon (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), enquanto que para o *blank* foi utilizado 1 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL de solução de reagente de Lowry (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) foi colocado em cada um dos tubos, os quais foram agitados por 10 segundos em agitador de tubos (Phoenix AP 56, Araraquara, SP, Brasil). Depois de 20 minutos em temperatura ambiente, 500 µL de solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) foram acrescentados aos tubos, reagindo por mais 30 minutos. Então, três alíquotas de 100 µL de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) sendo sua absorbância lida em leitor de ELISA (Tp Reader; Thermo Plate, Nanshan District, Shenzhen, China) no comprimento de onda de 655 nm. A média dos três valores foi calculada para a análise estatística dos dados.

Determinação da Atividade da Fosfatase Alcalina (FA)

Para esse protocolo, o meio de cultura foi aspirado, e as amostras lavadas por três vezes com 1 mL de PBS a temperatura de 37°C, para em seguida realizar a lise das células com a adição de 1 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) em cada compartimento da placa por 40 minutos em temperatura ambiente. Durante esse período foram preparados os tubos Falcon, devidamente identificados como testes, padrão e *blank*, sendo em seguida adicionados 50 µL do substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit) em cada tubo. Somente no tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão 45 U/L (reagente nº 4 do Kit). Depois de ocorrida a lise celular, em aproximadamente 40 minutos, os tubos foram colocados em banho-maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) a 37°C por 2 minutos. Então, 50 µL da amostra de cada compartimento foram transferidos para os tubos testes, depois de serem

homogeneizados, mantidos em banho-maria e agitados levemente. Após 10 minutos de incubação, 2 mL do reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit) foram adicionados, possibilitando assim a determinação da absorbância, por meio do leitor de ELISA (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China), no comprimento de onda de 590 nm. O protocolo para leitura da absorbância foi o mesmo utilizado na análise da PT (3 alíquotas de cada compartimento da placa de cultivo celular passadas para a placa de 96 compartimentos).

A atividade de fosfatase alcalina foi calculada por meio da obtenção de uma curva padrão, com concentrações pré-determinadas desta enzima. O valor de proteína total foi utilizado para a normalização dos valores de fosfatase alcalina em função da produção de proteína total.

Análise do Tipo de Morte Celular (Citometria de Fluxo)

A anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos, possuindo alta afinidade pela fosfatilserina, um lipídeo que se localiza na superfície interna da membrana citoplasmática. Se as células entram em processo de apoptose, a fosfatilserina é transferida para a camada externa da membrana celular, ligando-se assim a anexina V, tornando possível a identificação das células que passaram pelo processo apoptótico. O iodeto de propídio (PI) é um marcador fluorescente de morte celular por necrose, pois a membrana citoplasmática das células que sofrem esse processo de morte encontra-se danificada, permitindo então a ligação do iodeto de propídio com o DNA da célula.

Após 24 horas de contato com o extrato, as células foram tratadas com tripsina e centrifugadas a 5000 rpm por 2 minutos, sendo o sobrenadante aspirado e as células

ressuspendidas em 300 μ L de tampão de ligação, que contém 10 mM de HEPES (pH 7,4) cuja composição química compreende 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$ e 1,8 mM de $CaCl_2$. Para marcação de células que passaram pelo processo de necrose, foram adicionados 3 μ L da solução de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), na concentração de 100 μ g do reagente por mL da solução tampão, na suspensão de células imediatamente antes da leitura em citômetro de fluxo, enquanto que para identificação de morte celular por apoptose o reagente anexina V (Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brasil) foi adicionado na concentração de 1:500 na suspensão de células e deixados por 20 minutos no escuro antes da leitura. As amostras foram adquiridas em canal de FL-1 do citômetro de fluxo para a anexina e FL-2 para iodeto de propídio. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto equipado com laser de argônio e software BD FACSCanto™ Software (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). A forma de obtenção dos dados para a análise estatística ocorre em porcentagem do número de células marcadas pelo fluorocromo (anexina ou iodeto de propídio) em relação a porcentagem do número total de células MDPC-23 reconhecidas pelo citômetro de fluxo.

Análise da Morfologia Celular (MEV)

Dois espécimes de cada grupo foram destinados para a avaliação da morfologia das células MDPC-23 em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960; Carl. Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha). Para isso, lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) foram posicionadas na base dos compartimentos antes do cultivo das células. Para esta etapa do experimento, as lamínulas foram previamente lavadas com uma solução salina fosfatada tamponada (PBS) e esterilizadas quimicamente em etanol a 70% por no

mínimo 6 horas. Em seguida, em capela de fluxo laminar vertical, foram lavadas em PBS, por três vezes sob agitação constante, durante 15 minutos cada lavagem, para remoção de resíduos da solução de etanol. Então, estas lamínulas foram posicionadas no fundo dos compartimentos da placa de cultivo celular que foram preenchidos com 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, viabilizando o plantio das células como no início do experimento. O meio de cultura foi substituído pelos extratos obtidos como descrito anteriormente, mantido em contato com as células por 24 horas. Decorrido esse período, os extratos foram aspirados e as células aderidas as lamínulas de vidro foram fixadas por 24 horas em glutaraldeído 2,5%. Posteriormente a fixação inicial das células, estas foram submetidas a lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos, nova lavagem por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem), seguida de lavagem por duas vezes em 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem), desidratação em 1mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% (30 minutos em cada solução) e lavagem por três vezes com 200 µL de HMDS (HMDS 1,1,1,3,3,3, Hexamethyldisilazane, 98% - ACROS Organics, Morris Plains, NJ, EUA), 20 minutos cada lavagem. Finalmente, a solução de HMDS foi desprezada e os recipientes foram tampados e mantidos por 12 horas no dessecador. Decorrido esse tempo, as lamínulas contendo as amostras foram fixadas em *stubs*, metalizadas e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960; Carl. Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha).

Determinação do grau de conversão monomérica

O grau de conversão foi determinado utilizando o espectrômetro infravermelho transformado de Fourier (FTIR) (Spectrum 100 Optica; PerkinElmer, MA, EUA), equipado com o

dispositivo de reflectância atenuada (ATR), o qual é composto por um cristal horizontal de seleneto de zinco (SeZn) (Pike Technologies, Madison, WI, EUA). O grau de conversão é calculado utilizando padrões previamente estabelecidos (Rueggeberg *et al.*²³, 1988), baseados na razão entre os picos de 1638 cm^{-1} (cadeias alifáticas de ligações duplas entre carbonos) e 1608 cm^{-1} (cadeias aromáticas entre carbonos que originam os anéis benzênicos das moléculas de monômeros, sendo estes utilizados como base, uma vez que sua intensidade permanece inalterada durante o processo de polimerização). Dessa forma, 3 μL de cada sistema adesivo experimental foram aplicados diretamente na face horizontal do cristal, e cobertos com tira de poliéster sobre o adesivo não polimerizado, a fim de impedir a formação da camada inibida de oxigênio. Os gráficos para o cálculo do *baseline* (amostra não polimerizada) foram obtidos previamente a aplicação da luz para todos os espécimes.

Em seguida, a fotoativação ($510\pm 10\text{ mW/cm}^2$, Optilux 500, Kerr Company, Orange, CA, EUA) foi realizada por 10 segundos dando origem ao gráfico representativo dos valores utilizados no cálculo do grau de conversão.

Análise Estatística

Os dados de cada variável resposta (metabolismo celular, expressão de proteínas totais, atividade da fosfatase alcalina, tipo de morte celular e grau de conversão monomérica) foram submetidos a testes de Kruskal-Wallis, complementados por testes de Mann-Whitney para comparação dos grupos aos pares. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Produtos Celulares (enzima SDH, proteínas totais e fosfatase alcalina)

Os valores de produção da enzima SDH (metabolismo celular), proteína total (PT) e fosfatase alcalina (FA) pelas células MDPC-23 em contato com os extratos obtidos dos adesivos experimentais estão apresentados na Tabela 2. Os menores valores de produção da enzima SDH foram observados para o extrato do adesivo R5, seguido do adesivo R1, ambos estatisticamente diferentes do controle (R0). Entretanto, R5 foi estatisticamente diferente de R1, sendo considerado o adesivo mais tóxico avaliado neste estudo. R2 e R3 não diferiram do controle (R0), sendo considerados não citopáticos, e como consequência, não influenciando negativamente a respiração mitocondrial das células MDPC-23. Quanto ao grupo R4, embora não tenha diferido do controle, o mesmo também não diferiu estatisticamente do adesivo R1, assumindo uma posição intermediária quanto a citotoxicidade. Considerando R0 como 100% de metabolismo celular, foi observado que R1, R2, R3, R4 e R5 reduziram o metabolismo em 36,4%, 3,1%, 0,2%, 21,5% e 65,7%, respectivamente.

Produção de proteína total estatisticamente inferior ao controle foi observada para os extratos obtidos dos sistemas adesivos R1, R4 e R5. Foi observado que R1 diferiu estatisticamente de R5, sendo este último o mais tóxico. Assim como para a produção da enzima SDH, os grupos R2 e R3 não foram estatisticamente diferentes do controle (R0), embora R3 também não tenha sido diferente de R1 e R4.

Novamente, assim como demonstrado para os produtos celulares anteriormente descritos, os adesivos R2 e R3 não diferiram do controle quanto a atividade de fosfatase alcalina. A menor produção de fosfatase alcalina foi observada para o adesivo R5, seguido do adesivo R1, sem diferença entre eles. Apesar da redução da atividade de FA para R1 ter sido

estatisticamente comparável ao do grupo R5, o primeiro não diferiu de R2, R3 e R4, demonstrando, dessa forma, que R1 assumiu uma posição intermediária entre os extratos avaliados nesse estudo.

Considerando-se a produção conjunta dos produtos celulares identificados, pode ser inferido que, em linhas gerais, os extratos produzidos pelos adesivos experimentais R2 e R3 apresentaram os menores efeitos citopáticos sobre as células MDPC-23, efeitos esses comparáveis aos observados quando nenhum material foi aplicado sobre os discos de papel (grupo controle).

A citotoxicidade dos sistemas adesivos experimentais sobre o metabolismo das células MDPC-23 não foi significativamente correlacionado ao grau de hidrofília desses adesivos (Spearman, $p > 0,05$). Essa ausência de correlação significativa foi observada para todos os produtos celulares investigados no estudo, embora o coeficiente de correlação tenha sido alto para a produção da enzima SDH ($r^2 = -0,77$). Isso indicou que quanto maior o grau de hidrofília, menor a produção dessa enzima, ou seja, mais tóxico foi o material para as células em cultura. O mesmo coeficiente de correlação foi de -0,54 e -0,65 para a produção de proteína total e fosfatase alcalina, respectivamente.

Morte celular por necrose (Iodeto de propídio - PI) e por apoptose (Anexina)

Os dados de morte das células MDPC-23 por apoptose (anexina) e por necrose (iodeto de propídio), quando em contato com os extratos dos diferentes adesivos experimentais, estão graficamente apresentados nas Figuras 1a e 1b, respectivamente. Pequenas porcentagens de morte celular por apoptose foram observadas para os grupos R1, R2, R3 e R4, as quais não diferiram estatisticamente do controle (R0). Contrariamente, o adesivo R5 resultou nos maiores

valores de morte celular por apoptose, com valores variando entre 14 e 35% (mediana = 21,7%). Esse grupo foi estatisticamente diferente de todos os demais, incluindo o grupo controle. Todos os extratos resultaram em morte celular por necrose. Entretanto, os extratos dos adesivos R2 e R3 não diferiram estatisticamente do grupo controle (R0) ou mesmo entre si. R1 e R4 também foram estatisticamente semelhantes quanto a indução de morte celular por necrose, e ambos os adesivos não diferiram do grupo R5. Morte celular por necrose foi o tipo mais prevalente para todos os adesivos investigados (Figura 2).

Caracterização da morfologia celular em MEV

Para R2 e R3 um grande número de células odontoblastóides MDPC-23 permaneceu aderido a superfície da lamínula de vidro (Figuras 3e e 3f; Figuras 4a e 4b), semelhante ao observado para o grupo controle R0 (Figuras 3a e 3b). Estas células, pertencentes aos grupos R2 e R3, as quais estavam próximas da confluência, exibiam amplo citoplasma, do qual originavam numerosos e finos prolongamentos citoplasmáticos. Estes prolongamentos pareciam aderir as células pulpare a superfície da lamínula. Para R1 (Figuras 3c e 3d), R4 (Figuras 4c e 4d) e R5 (Figuras 4e e 4f), um menor número de células permaneceu aderido as lamínulas de vidro. Estas células apresentavam tamanho reduzido, morfologia arredondada e com nenhum ou poucos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Assim, extensas áreas de substrato (vidro) sem células ou com fragmentos de membrana celular puderam ser observados.

Grau de conversão monomérica

As porcentagens referentes ao grau de conversão monomérica dos adesivos experimentais fotoativados por 10 segundos estão apresentadas na Tabela 3. Em linhas gerais, pode ser inferido que sistemas adesivos mais hidrófilos apresentam valores de grau de conversão monomérica maior quando comparados aos valores obtidos por adesivos hidrófobos, de tal forma que R1 teve um grau de conversão (*ca.* 37%) significativamente menor quando comparado a R3, R4 e R5 (entre *ca.* 54 e 56%), os quais não diferiram entre si. R2 apresentou valores intermediários (*ca.* 50%) a esses dois subgrupos.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o potencial citotóxico de adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofilia sobre células odontoblastóides em cultura. Para obtenção dos graus de hidrofilia, distintas formulações foram necessárias, condição esta impeditiva da comparação direta dos adesivos considerando-se esse fator isoladamente. A composição, o grau de conversão monomérica e o pH dos adesivos são todos fatores que certamente influenciaram na citotoxicidade desses materiais. Portanto, todas essas características devem ser consideradas conjuntamente para a análise comparativa do efeito citopático de sistemas adesivos.

A avaliação da citotoxicidade de sistemas adesivos com a utilização de papéis filtro tem sido relatada na literatura²⁴⁻²⁶ sendo desenvolvida como análise preliminar de baixo custo para uma seleção inicial de novas formulações. Essa metodologia reproduz um desafio extremo de exposição das células em cultura aos componentes lixiviados dos materiais teste. Assim, o contato dos componentes dos sistemas adesivos com as células via obtenção de extratos

permite discriminar quais materiais apresentam os maiores efeitos tóxicos, sendo que a não ocorrência desses apenas sugere segurança na aplicação desses adesivos quando estiver presente a barreira dentinária. A citotoxicidade transdentinária pode ser considerada como segunda etapa na avaliação dos efeitos citopáticos de materiais dentários²⁷, quando desenvolvidos e indicados para utilização sobre dentina.

A despeito do maior grau de conversão monomérica (56%) e menor concentração de BisGMA (40%), o adesivo mais hidrófilo (R5) apresentou maior citotoxicidade do que os demais, seguido do adesivo mais hidrófobo (R1). Isso pode ser explicado pelo fato do ambiente aquoso proporcionado pelo meio de cultura ter favorecido a difusão de monômeros mais hidrófilos como HEMA, presente em 28,75% da composição de R5. Essa mesma concentração de HEMA também está presente nos adesivos R3 e R4, entretanto, quando considerados outros fatores que podem ter influenciado o efeito citotóxico dos adesivos investigados, o adesivo R5 é o que possui menor pH (*ca.* 3). Tem sido demonstrado que a acidez do meio de cultura (pH 6,4), quando colocado em contato com células que expressam a proteína BAX Inhibitor-1 (BI-1), induz a um aumento no acúmulo de íons Ca^{2+} mitocondrial e citoplasmático, fator relacionado a liberação de citocinas pró-inflamatórias e morte celular, de maneira pH e tempo-dependentes²⁸.

Os principais componentes dos sistemas adesivos, como BisGMA, HEMA e TEGDMA, quando testados individualmente, já mostraram ser tóxicos e moduladores de funções celulares²⁹⁻³⁰. Tem sido demonstrado que o BisGMA é o monômero mais tóxico, seguido sequencialmente por UDMA, TEGDMA e HEMA, pois consegue reduzir a síntese protéica e induzir a morte celular⁴. De acordo com Bakopoulou *et al.*⁵ (2009), o BisGMA, apesar do seu caráter hidrófobo que limita a sua liberação em ambiente aquoso, pode ser considerado tóxico

mesmo em baixas concentrações quando comparado com HEMA e TEGDMA, influenciando mecanismos como o estresse oxidativo. Essa influência, indiretamente, altera o processo biológico normal das células, incluindo diferenciação celular, resposta imune e reparação celular. Por outro lado, sistemas adesivos que possuem HEMA em sua composição também podem ser tóxicos as células, pois este monômero, além de ser hidrófilo, possui baixo peso molecular, o que possibilita sua difusão em grandes quantidades pela dentina, podendo atingir o tecido pulpar e conseqüentemente causar danos irreversíveis. HEMA e TEGDMA podem induzir morte celular por necrose e apoptose de maneira concentração-dependente, sendo que em concentrações maiores ocorre prevalência de morte por necrose³¹⁻³², fator também observado na presente pesquisa, pois os sistemas adesivos experimentais que continham HEMA ou TEGDMA em sua composição apresentaram morte celular por necrose, sendo que para os grupos R1, R4 e R5 esses valores foram significativamente maiores (maior valor encontrado para R5, de aproximadamente 40%).

A liberação de monômeros resinosos ocorre devido ao processo de degradação sofrido por esses sistemas, especialmente os mais hidrófilos, ou devido a polimerização incompleta desses materiais (monômeros residuais)³³. Ainda hoje não se conseguiu alcançar a conversão total dos monômeros em polímeros durante o processo de polimerização de sistemas adesivos. Espera-se que ao final da polimerização inicial a maioria dos monômeros reaja formando cadeias poliméricas e a quantidade de monômero residual seja pequena (entre 1,5% a 5%)³⁴. Contudo, para os adesivos investigados no presente estudo, o valor do grau de conversão variou entre 37% (para R1) a 56% (para R4 e R5). Sistemas adesivos comercialmente disponíveis apresentam valores de grau de conversão que variam de 20 a 50%, sendo que esta variação ampla é comandada por fatores inerentes a composição dos sistemas adesivos, tipo de luz

(halógena ou LED), intensidade (potência do aparelho) e tempo de fotoativação³⁵⁻³⁶. Apenas para o grau de conversão, correlação positiva significativa foi observada ($R^2=0,95$) considerando-se o aumento do grau de hidrofília.

A reação de polimerização de cada monômero depende da mobilidade e densidade das ligações cruzadas do reagente²¹. Por esse motivo, o aumento da concentração de BisGMA no sistema adesivo aumenta sua viscosidade, resultando na desaceleração da reação e conseqüentemente na diminuição do grau de conversão³⁷. BisADM, presente no adesivo R1, é um monômero menos flexível e mais viscoso quando comparado com o BisGMA, propriedades as quais conseguem diminuir o grau de conversão do sistema adesivo, quando este monômero encontra-se em altas concentrações. Pode-se dizer então que o grau de hidrofília influencia no grau de conversão de materiais poliméricos^{17,38}.

A expressão de fosfatase alcalina foi negativamente influenciada pelo contato das células MDPC-23 com os extratos obtidos de R1 e R5. Essa proteína participa do processo de mineralização da matriz dentinária, sendo a sua expressão uma marca fenotípica dos odontoblastos³⁹⁻⁴¹. A redução observada na presente pesquisa indica que esses sistemas adesivos apresentam um potencial efeito deletério na capacidade de reparação do complexo dentino-pulpar, uma vez que a produção de dentina terciária está diretamente relacionada com a atividade dessa enzima⁴². Tem sido demonstrado que os monômeros HEMA e TEGDMA, quando colocados em contato com cultura primária de células da polpa de dentes decíduos, são capazes de reduzir a atividade de fosfatase alcalina, do metabolismo celular, da formação de nódulos de mineralização e da expressão de marcadores de mineralização, expressos durante o processo de reparo, como por exemplo BSP (sialoproteína óssea), DSPP (sialofosfoproteína da dentina) e OCN (osteocalcina)⁴³.

O padrão de morte celular é importante para avaliação da citotoxicidade de materiais adesivos, já que células apoptóticas são removidas por fagocitose, gerando resposta inflamatória leve, enquanto que a necrose pode causar maior resposta inflamatória e injúria aos tecidos circundantes⁴⁴. Para todos os adesivos investigados, o tipo de morte celular prevalente foi a necrose, sendo que R5 apresentou maior número de células mortas (ca. 60%), quando comparado com outros adesivos, retificando seu maior efeito tóxico para as células, como já discutido com base nos produtos celulares.

Pode ser inferido, pelos resultados do presente estudo, que não apenas a hidrofília, mas outras características dos sistemas adesivos como tipo e quantidade dos seus constituintes, pH, e grau de conversão monomérica, exercem efeito em seu potencial citopático. Por esta razão, é imprescindível que testes biológicos sejam também realizados adicionalmente aos testes mecânicos para que o produto final seja adequado para utilização em seres humanos. Conhecedores do fato de que o tecido dentinário exerce função protetora contra a difusão de produtos de materiais dentários até o tecido pulpar⁴⁵, investigações futuras devem avaliar a citotoxicidade transdentinária dos sistemas adesivos utilizados no presente estudo.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir, de acordo com as condições experimentais, que os sistemas adesivos R2 e R3 foram os únicos não tóxicos as células MDPC-23. Portanto, o grau de hidrofília e de conversão monomérica não respondem, isoladamente, pelo efeito citopático de sistemas adesivos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2009/06446-5) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 473453/2009-6) pelo apoio financeiro, assim como a Julhiany de Fatima da Silva, pelo auxílio com as análises de citometria de fluxo.

REFERÊNCIAS

1. Söderholm KJ. Correlation of in vivo and in vitro performance of adhesive restorative materials: a report of the ASC MD156 Task Group on Test Methods for the Adhesion of Restorative Materials. *Dent Mater* 1991; 7 (2): 74-83.
2. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: A review. *Dent Mater* 1996; 12: 186-193.
3. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater* 1999; 15: 434-441.
4. Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 2003; 31 (3): 223-229.
5. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 3861-3899.
6. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous

monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2002; 63: 418-423.

7. Franz A, König F, Lucas T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dent Mater* 2009; 25 (2): 232-239.

8. Yoshii, E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater* 1997; 37: 517-524.

9. Faria e Silva AL, Piva E, Moraes RR. Time-dependent effect of refrigeration on viscosity and conversion kinetics of dental adhesive resins. *Eur J Dent* 2010; 4:150-155.

10. Yiu CK, King NM, Carrilho MR, Sauro S, Rueggeberg FA, Prati C, Carvalho RM, Pashley DH, Tay FR. Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. *Biomaterials* 2006; 27 (9): 1695-1703.

11. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003; 69 (11): 726-731.

12. Albaladejo A, Osorio R, Toledano M, Ferrari M. Hybrid layers of etch-and-rinse versus self-etching adhesive systems. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15 (1): 112-118.

13. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Carvalho RM, Hosaka K, Reis A, Loguercio AD, Pashley DH. Membrane permeability properties of dental adhesives films. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2009; 88: 312-320.

14. Cadenaro M, Breschi L, Antonioli F, Navarra CO, Mazzoni A, Tay FR, Di Lenarda R,

Pashley DH. Degree of conversion of resin blends in relation to ethanol content and hydrophilicity. *Dent Mater* 2008; 24: 1194-1200.

15. Reis AF, Giannini M, Pereira PNR. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin–dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater* 2007; 23: 1164-1172.

16. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiuf C, *et al.* Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 2005; 26: 6449-6459.

17. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MRO. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental Mater* 2006; 22: 973-980.

18. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 88 (2): 558-578.

19. Becker TD, Agee KA, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, Tay FR, Pashley DH. Infiltration/evaporation induced shrinkage of demineralized dentin by solvated model adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; 80 (1): 156-165.

20. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, Donnelly A, García-Godoy F. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent* 2007; 20 (1): 7-20.

21. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee KA, Di Lenarda R, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater* 2009; 25 (1): 39-47.
22. Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* 1981; 116 (1): 53-64.
23. Rueggeberg FA, Craig RG. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. *J Dent Res* 1988; 67 (6): 932-937.
24. Korkmaz Y, Ozalp M, Attar N. Comparison of the antibacterial activity of different self-etching primers and adhesives. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9 (7): 57-64.
25. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *Am J Dent* 2002; 15 (6): 356-360.
26. Chen RS, Liuw CC, Tseng WY, Hong CY, Hsieh CC, Jeng JH. The effect of curing light intensity on the cytotoxicity of a dentin-bonding agent. *Oper Dent* 2001; 26 (5): 505-510.
27. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* 2002; 28 (3): 188-192.
28. Lee GH, Hwang JD, Choi JY, Park HJ, Cho JY, Kim KW, Chae HJ, Kim HR. An acidic pH environment increases cell death and pro-inflammatory cytokine release in osteoblasts: the involvement of BAX Inhibitor-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(9): 1305-1317.
29. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A. TEGDMA-

induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater* 2003; 66 (3): 476-482.

30. Heil TL, Volkmann KR, Wataha JC, Lockwood PE. Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. *J Oral Rehabil* 2002; 29 (5): 401-407.

31. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater* 2007; 23 (1): 34-39.

32. Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dent Mater* 2008; 24 (1): 134-140.

33. Falconi M, Teti G, Zago M, Pelotti S, Breschi L, Mazzotti G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Toxicol* 2007; 23 (5): 313-322.

34. 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.

35. Arrais CAG, Pontes FM, Santos LPS, Leite ER, Giannini M. Degree of conversion of adhesive systems light-cured by LED and halogen light. *Braz Dent J* 2007; 18 (1): 54-59.

36. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002; 23: 1819-

1829.

37. Bae JH, Cho BH, Kim JS, Kim MS, Lee IB, Son HH, Um CM, Kim CK, Kim OY. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74 (2): 822-828.

38. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, Biasotto M, Contardo L, Breschi L. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci* 2005; 113 (6): 525-530.

39. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res* 1998; 37: 233-249.

40. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, *et al.* Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 9445-9449.

41. Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, *et al.* TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res* 2011; 90: 257-262.

42. Murray PE, Hafez AA, Windsor LJ, Smith AJ, Cox CF. Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *J Dent* 2002; 30(5-6): 213-222.

43. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, *et al.* Effects of HEMA and TEGDMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dent Mater* 2011; 27: 608-617.

44. Okada Y, Maeno E, Mori S. Anion channel involved in induction of apoptosis and necrosis. *Adv Exp Med Biol* 2004; 559: 205-209.

45. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J* 2002; 35 (11): 905-909.

Tabela 1. Composição dos adesivos experimentais e seus respectivos parâmetros de solubilidade Hoy e pH.

Adesivo	Composição ^a	Parâmetro de solubilidade ADESIVO NÃO SOLVATADO			
		δ_d	δ_p	δ_h	δ_t
R1 pH~7	70,0% BisADM 28,75% TEGDMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,0	10,3	6,6	19,4
R2 pH~7	70,0% BisGMA 28,5% TEGDMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,9	12,4	6,9	21,2
R3 pH~7	70,0% BisGMA 28,74% HEMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,6	13,0	8,5	22,1
R4 pH~4	40,0% BisGMA 30,0% TCDM 28,75% HEMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	16,2	13,5	9,0	23,0
R5 pH~3	40,0% BisGMA 30,0% BisMP 28,75% HEMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,1	13,5	11,1	23,1

^a Cadenaro *et al*²¹. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. Dent Mater 2009; 25: 39-47.

Abreviaturas: BisADM = etoxylated-BisPhenol A dimethacrylate; BisGMA= 2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloylpropoxy)]-phenyl propane; TEGDMA= triethyleneglycol dimethacrylate; HEMA= 2-hydroxyethyl methacrylate; TCDM= di(hydroxyethylmethacrylate)ester of 5-(2,5-dioxotetrahydrofurfuryl)-3-methyl-3-cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid; CQ=camphoroquinone; EDMAB=2-ethyl dimethyl-4-aminobenzoate

Tabela 2. Produção da enzima desidrogenase succínica (SDH, densidade óptica), expressão de proteína total (U/L) e atividade da fosfatase alcalina (U/L por mg/L de proteína) por células MDPC-23 em contato com os extratos dos diferentes adesivos experimentais.

Adesivos experimentais	Produto celular		
	Enzima SDH	Proteína total	Fosfatase alcalina
R0	0,571 (0,531-0,697) ^a	108,904 (101,508-133,128) ^a	1,32 (0,87-1,97) ^a
R1	0,363 (0,325-0,426) ^b	76,544 (69,147-104,282) ^b	0,27 (0,17-0,50) ^{bc}
R2	0,553 (0,482-0,617) ^a	118,890 (94,111-126,841) ^a	0,89 (0,59-1,16) ^{ab}
R3	0,570 (0,504-0,615) ^a	95,590 (87,269-107,239) ^{ab}	0,78 (0,34-1,41) ^{ab}
R4	0,448 (0,370-0,581) ^{ab}	81,537 (74,140-89,303) ^{bc}	0,45 (0,32-1,13) ^{ab}
R5	0,196 (0,100-0,338) ^c	53,984 (11,453-65,263) ^c	0,08 (0,01-0,11) ^c

^a Valores representam a mediana (percentil 25-percentil 75), n=8. Para cada produto celular (colunas), valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05). R0 = controle, sem aplicação de sistema adesivo, R1 – R5 = sistemas adesivos em ordem crescente de grau de hidrofília.

Tabela 3. Grau de conversão monomérica (%) dos adesivos experimentais após fotoativação por 10 segundos com aparelho de luz halógena.

Adesivo experimental	Tempo de fotoativação
	10 segundos
R1	36,7 (34,9-37,5) ^c
R2	50,0 (49,8-50,0) ^{bc}
R3	53,7 (53,6-53,7) ^{ab}
R4	56,5 (56,2-56,5) ^a
R5	56,1 (56,1-56,4) ^a

^{abc} Valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=5. Medianas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$). R0 = controle, sem aplicação de sistema adesivo, R1 – R5 = sistemas adesivos em ordem crescente de grau de hidrofília.

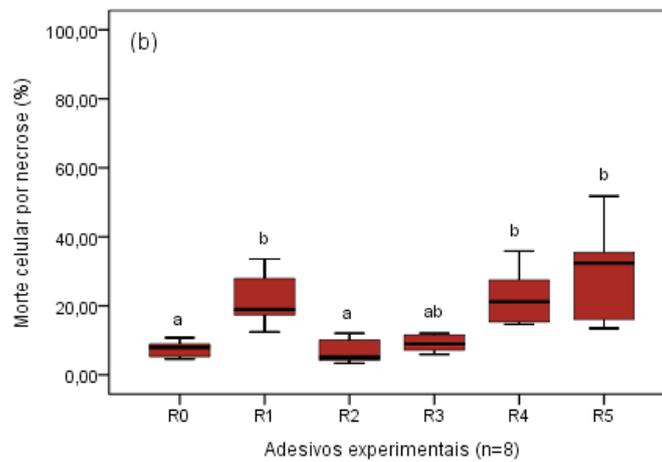
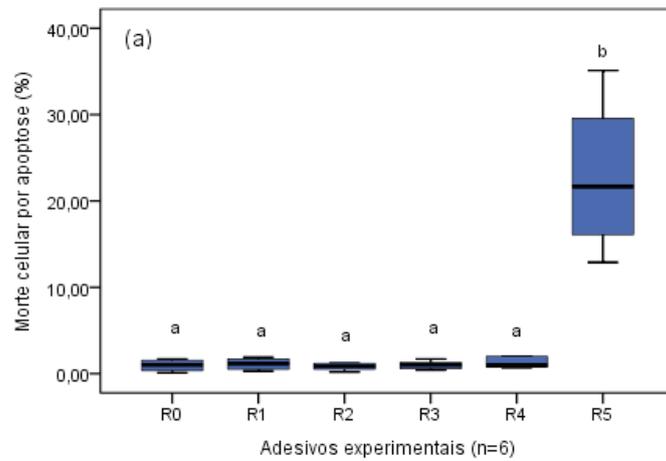


Figura 1. (a) Porcentagem de células MDPC-23 marcadas pela anexina V, indicativo de morte celular por apoptose e (b) pelo iodeto de propídio (PI), indicativo de morte celular por necrose. Colunas representadas com a mesma letra não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$). Observar diferença na escala dos eixos y. R0 = controle, sem aplicação de sistema adesivo, R1 – R5 = sistemas adesivos em ordem crescente de grau de hidrofília.

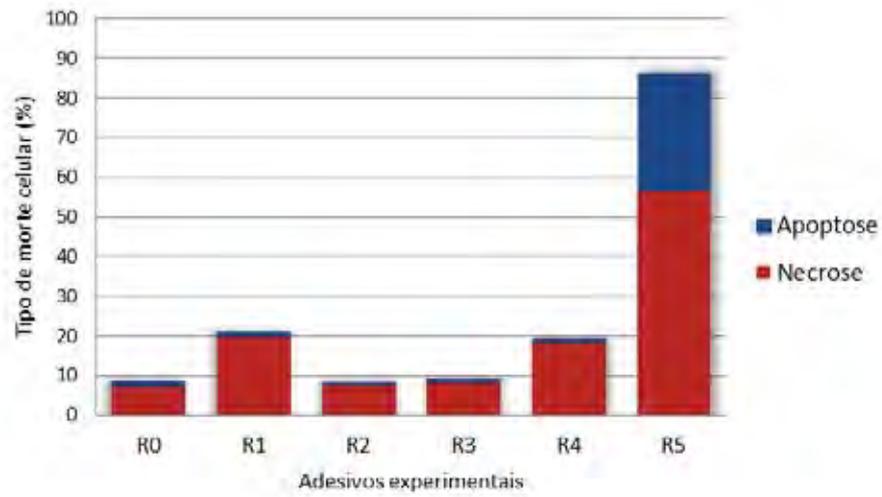


Figura 2. Frequência, em porcentagem, do tipo de morte das células MDPC-23, morte por necrose ou por apoptose, quando em contato com os extratos obtidos a partir dos adesivos experimentais. R0 = controle, sem aplicação de sistema adesivo, R1 – R5 = sistemas adesivos em ordem crescente de grau de hidrofília.

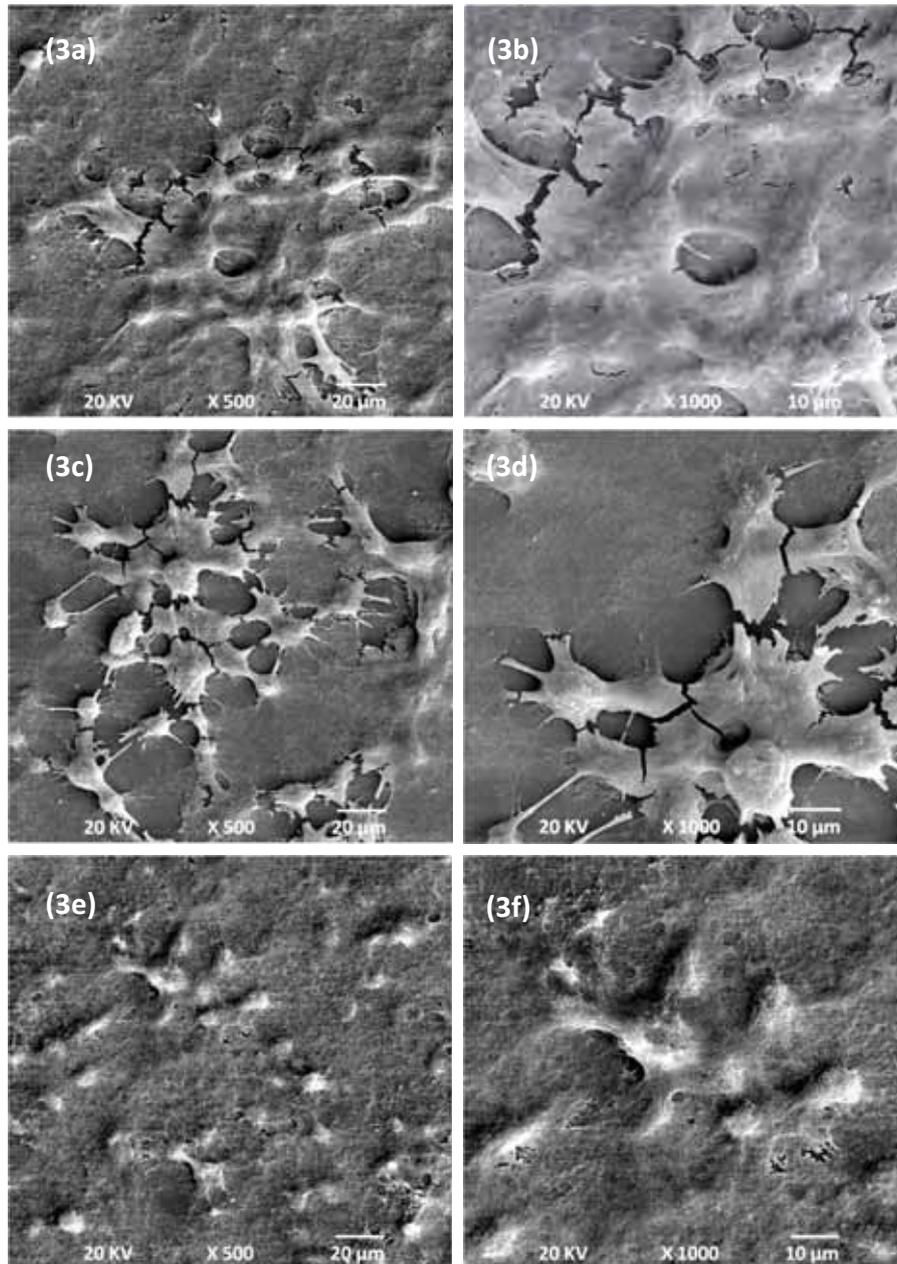


Figura 3. (a) e (b) Fotomicrografias representativas do grupo controle (R0). (a) Células odontoblastóides em confluência ocupando toda a superfície da lamínula de vidro. MEV x500. (b) Detalhe da figura 3a, onde pode-se observar células com amplo citoplasma, as quais estão organizadas em nódulo epitelióide. MEV x1000

Figura 3. (c) e (d) Fotomicrografias representativas do adesivo R1. (c) Ampla área de lamínula livre de células. MEV x500. (d) Note as poucas células com prolongamentos citoplasmáticos e ampla área de lamínula com restos estruturais de células mortas. MEV x1000

Figura 3. (e) e (f) Fotomicrografias representativas do adesivo R2. (e) Grande número de células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro. MEV x500. (f) Maior aumento da figura anterior, onde pode-se observar o amplo citoplasma das células. MEV x1000

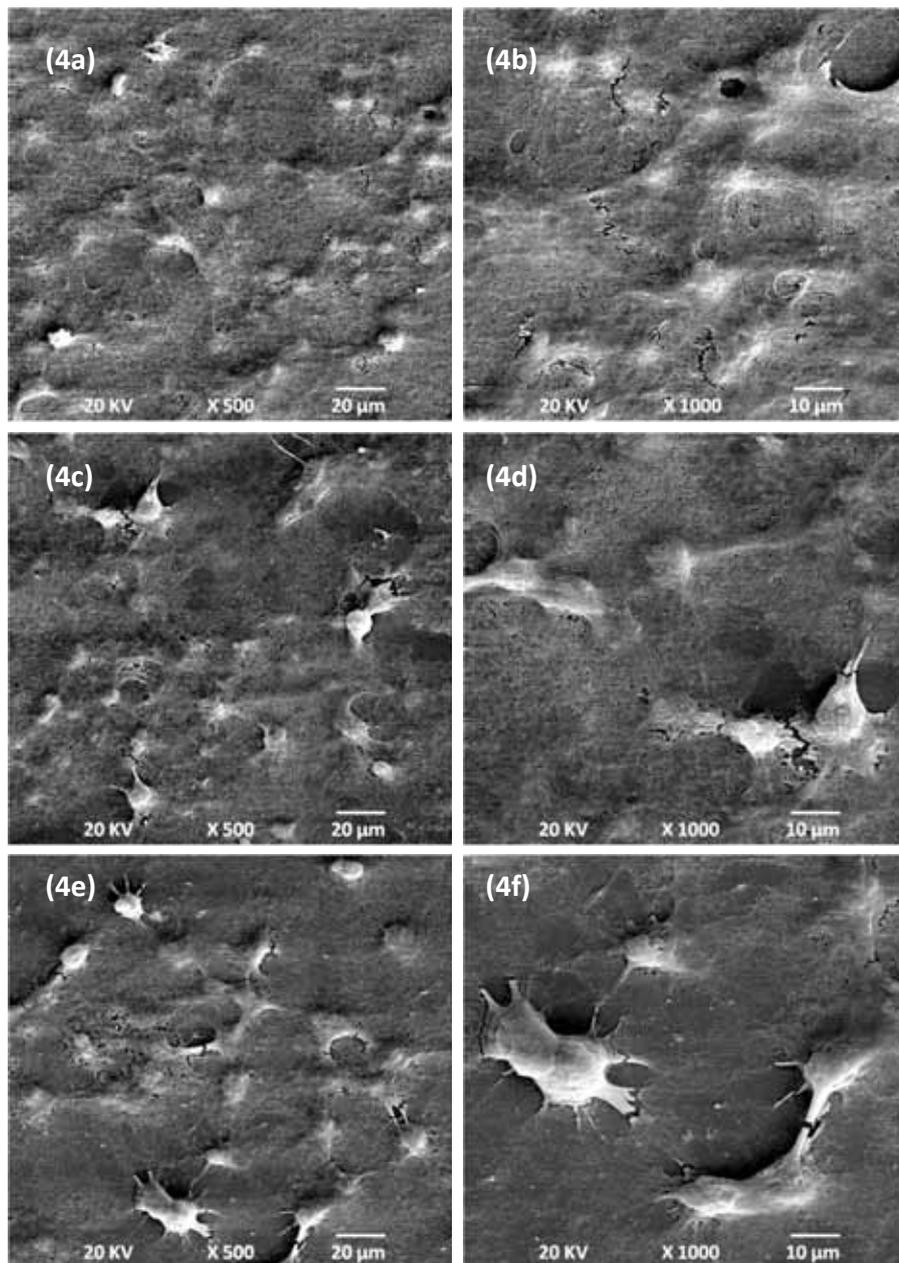


Figura 4. (a) e (b) Fotomicrografias representativas do adesivo R3. (a) Tal como observado na figura 3e, um grande número de células odontoblastóides recobre a lamínula de vidro. MEV x500. (b) Detalhe da figura 4a, onde as células em confluência ocupam todo substrato. MEV x1000

Figura 4. (c) e (d) Fotomicrografias representativas do adesivo R4. (c) Apesar da presença de células, áreas da lamínula de vidro encontram-se expostas. MEV x500. (d) Maior aumento da figura 4c, onde células de morfologia arredondada e contraída são observadas entre ampla área de substrato de vidro exposto. MEV x1000

Figura 4. (e) e (f) Fotomicrografias representativas do adesivo R5. (e) Poucas células odontoblastóides são observadas sobre a lamínula de vidro. MEV x500. (f) Detalhe da figura anterior, onde células pequenas e de morfologia arredondada, com poucos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos são observados entre áreas de extensa exposição de substrato de vidro livres de células. MEV x1000

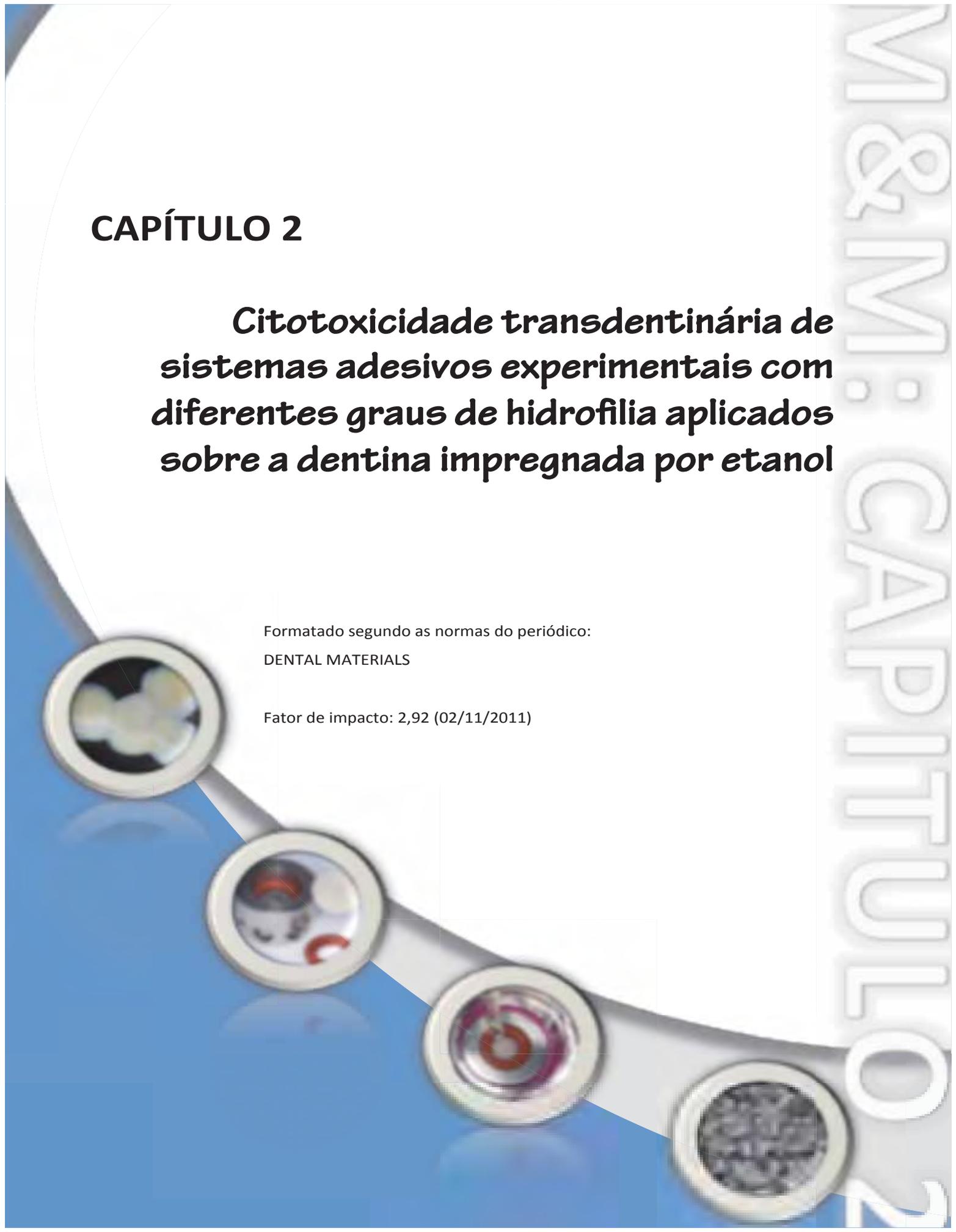
CAPÍTULO 2

Citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofilia aplicados sobre a dentina impregnada por etanol

Formatado segundo as normas do periódico:
DENTAL MATERIALS

Fator de impacto: 2,92 (02/11/2011)

M&M: CAPÍTULO 2



Citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos experimentais com diferentes graus de hidrofilia aplicados sobre a dentina impregnada por etanol

Luciana Bianchi

Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Ana Paula Dias Ribeiro

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Marcela Rocha de Oliveira Carrilho

Departamento de Biomateriais, Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Carlos Alberto de Souza Costa

Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Josimeri Hebling

Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: adesivos dentinários, citotoxicidade, etanol, dentina, células odontoblastóides

Correspondência:

Prof^a Dr^a Josimeri Hebling

UNESP – Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara

Rua Humaitá, 1680 Araraquara, São Paulo 14801-903 – Brasil

e-mail: jhebling@foar.unesp.br

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade transdentinária de sistemas adesivos experimentais (SAEs) com diferentes graus de hidrofília e da solução de solvatação da dentina sobre células odontoblastóides. Cem discos de dentina com 0,4 mm de espessura foram preparados, montados em câmaras pulpare e divididos em 10 grupos. Sobre a superfície pulpar foram plantadas células MDPC-23. Decorridas 48 h, sobre o lado oclusal, após condicionamento ácido e impregnação da dentina desmineralizada com água ou etanol, foi aplicado um dos SAEs (R2, R3, R4 ou R5), sendo R0 o grupo controle (sem adesivo). Após 24 h, 8 discos foram utilizados para quantificação da enzima SDH por meio do teste de MTT, e 2 discos foram utilizados para a análise da morfologia celular em MEV. O tipo de morte celular foi identificado por citometria de fluxo e o grau de conversão monomérica por espectroscopia (FTIR) após fotoativação por 10 ou 20 s. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) foram utilizados para a análise dos dados. A impregnação da dentina com etanol aumentou a porcentagem de morte celular por necrose para R3, R4 e R5 em comparação a água, a despeito do fato de que R3 e R4 induziram a uma maior produção de SDH. A fotoativação por 20 s melhorou significativamente o grau de conversão monomérica de todos os SAEs comparado a 10 s. Entretanto, correlação positiva foi registrada entre o grau de hidrofília e de conversão monomérica para ambos os tempos de fotoativação. Em conclusão, exceto para R2, a utilização de etanol favoreceu a citotoxicidade dos SAEs, expressa por indução de morte celular por necrose.

INTRODUÇÃO

Diversos fatores influenciam a adesão de materiais poliméricos ao substrato dentinário como tipo e composição dos sistemas adesivos, sua técnica de aplicação e características intrínsecas desse tecido, as quais determinam sua heterogeneidade regional. Por essa razão, a adesão a dentina não é considerada tão segura e previsível quanto a adesão ao esmalte [1-3] e portanto, a produção de uma união com qualidade capaz de superar os desafios impostos pela cavidade bucal ainda constitui um desafio.

Fibrilas de colágeno permanecem expostas após o estabelecimento da união resina-dentina devido a incompleta infiltração da dentina desmineralizada pelos monômeros resinosos [4-6]. Isso ocorre como resultado conjunto de uma série de fatores tais como a redução gradual dos espaços interfibrilares no sentido da dentina mineralizada, o alto peso molecular e hidrofília de alguns monômeros resinosos presentes nos adesivos dentinários [7,8] e o gradiente de umidade da dentina [9], o que permite a ocorrência do fenômeno de separação de fases [10]. Além destes fatores imediatos, fibrilas de colágeno podem ser expostas devido a degradação hidrolítica, em longo prazo, do componente polimérico [11] e lixiviação dos monômeros residuais e polímeros de baixo peso molecular. Uma vez expostas, essas fibrilas estão susceptíveis a degradação hidrolítica e enzimática, a qual pode ser mediada por enzimas presentes na própria dentina (metaloproteinases da matriz - MMPs, catepsinas).

Embora redução dos efeitos da degradação enzimática possa ser assegurada com a simples incorporação de clorexidina aos protocolos de adesão a dentina [12-14], a degradação hidrolítica ainda exerce efeito significativo, e talvez predominante, na deterioração da união resina-dentina, acometendo não apenas o conteúdo orgânico, mas também o polimérico.

A proposta de solvatação da dentina com etanol objetivando uma melhor infiltração desse substrato por monômeros hidrófobos e subsequente redução da susceptibilidade da interface a degradação hidrolítica foi introduzida em 2007 [15,16]. Segundo Tay *et al.* [17] a possibilidade de infiltração da dentina por monômeros hidrófobos como o BisGMA é baseada na mudança da característica intrinsecamente hidrófila da dentina condicionada para uma característica mais hidrófoba por meio da substituição da água pelo etanol (*ethanol-wet bonding*).

Aumento significativo na resistência de união e na durabilidade das interfaces produzidas ocorre quando utilizada a técnica denominada *ethanol-wet bonding*. Esses resultados são justificados pela melhor infiltração resinosa do substrato [18] e melhor selamento da matriz de colágeno, minimizando inclusive a ação colagenolítica endógena da dentina por meio das MMPs [19]. Adicionalmente, tem sido demonstrada redução significativa da permeabilidade dentinária após a aplicação de sistemas adesivos experimentais com conhecidos parâmetros de solubilidade sobre a dentina desmineralizada previamente impregnada por etanol [20].

Embora a proposta de impregnação da dentina com uma solução alcoólica favoreça a infiltração monomérica, quantitativa e qualitativamente, assim como a estabilidade longitudinal das interfaces produzidas, nenhuma informação existe na literatura quanto a possibilidade dessa técnica favorecer também os efeitos citopáticos de sistemas adesivos. Tem sido demonstrado que monômeros resinosos são capazes de se difundir pela dentina e alcançar o tecido pulpar subjacente em concentrações suficientes para eliciar reações adversas [21-25] e que esses efeitos são dose e tempo dependentes. Monômeros resinosos podem induzir a apoptose *in vitro* [26-28], entre outros eventos celulares e biológicos indesejáveis, tais como

interferência na síntese de ATP e no processo de mineralização da matriz dentinária, reações imunológicas e alterações genéticas [29,30].

Dessa forma, uma vez que a técnica de solvatação por etanol melhora a infiltração monomérica da dentina, especialmente por monômeros hidrófobos, a justificativa desse estudo baseia-se na hipótese de que a mesma técnica possa favorecer o efeito citopático exercido por sistemas adesivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos discos de dentina

Terceiros molares humanos hígidos (n=100) foram coletados mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Protocolo # 25/09). Os dentes, após remoção dos restos orgânicos, foram armazenados em solução de timol 0,12%, 4°C, e utilizados dentro de um período máximo de 3 meses após sua obtenção.

De cada dente foi obtido um único disco de dentina, correspondente a região imediatamente acima dos cornos pulpares. Para isto, cada dente foi fixado em uma base de madeira com godiva, e com auxílio de uma máquina para cortes ISOMET® 1000 (Precision Saw, BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco diamantado (BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA) e sempre refrigerado em água, um primeiro corte transversal foi realizado aproximadamente 2 mm acima da junção amelo-cementária no sentido oclusal, removendo desta forma as raízes dentárias. Cortes sequenciais foram realizados até a obtenção de uma superfície plana em dentina sem a presença de projeções dos cornos pulpares, inspecionada delicadamente, com auxílio de sonda exploradora. Em seguida, um novo corte foi realizado a 0,5 mm de distância

desta superfície, resultando na obtenção de um disco de dentina com essa espessura. Os discos foram cuidadosamente inspecionados em microscópio estereoscópico (modelo SZX7, Olympus, São Paulo, SP, Brasil) para verificação da presença de esmalte no lado oclusal e defeitos resultantes das projeções dos cornos pulpaes do lado pulpar.

Em seguida, os discos foram manualmente desgastados as custas da face oclusal, com lixa de carbetto de silício 320 umedecida com água destilada até a espessura final de 0,4 mm, determinada com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, SP, Brasil). Os discos de dentina (n=100) foram armazenados em tampão fosfato (PBS, pH 7,2), a 4°C, até a leitura de sua permeabilidade.

Determinação da permeabilidade dentinária (condutância hidráulica)

A determinação da permeabilidade dentinária foi realizada para permitir a distribuição homogênea dos discos de dentina nos grupos de investigação, eliminando a influência desta variável na avaliação da difusão transdentinária e citotoxicidade dos adesivos experimentais, os quais foram aplicados sobre os mesmos. A forma mais simples para avaliar a permeabilidade dentinária é calcular sua 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, segundo a fórmula:

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

onde, **Lp** 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 do 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 a determinação da condutância hidráulica, os discos foram individualmente posicionados em um dispositivo denominado câmara pulpar in vitro (*in vitro pulp chamber*, IVPC) modificado a partir do dispositivo original desenvolvido por Hanks *et al.* em 1996 [31]. Desta forma, a área de dentina disponível para a avaliação da condutância hidráulica foi padronizada para todos os discos em $0,28\text{ cm}^2$. Ambos os lados dos discos foram condicionados com solução EDTA (ácido etil diamino tetracético) 0,5 M, pH 7,2, por 60 segundos, para remover a *smear layer* criada durante o desgaste, seguido de lavagem abundante com água destilada.

Uma cânula metálica, presente no compartimento médio da IVPC, foi conectada por meio de um tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro (sonda naso-gástrica n. 8) a uma coluna de 180 cm de água. O disco permaneceu sob esta pressão por 5 minutos, após os quais a movimentação de uma bolha de ar introduzida na cânula foi registrada durante 1 minuto e os valores obtidos (**Jv**) transformados em valor de condutância segundo a fórmula apresentada anteriormente.

Determinada a condutância hidráulica, os discos individualmente identificados foram divididos (aleatorização em blocos) em 10 grupos ($n=10$) de tal forma que as médias e desvios-padrões desses grupos foram, considerando-se este fator de confundimento, estatisticamente comparáveis (ANOVA, $p>0,05$). Os discos foram então congelados individualmente em solução tamponada (PBS, pH 7,2) até o momento de sua utilização nos procedimentos de citotoxicidade.

Cultivo das células odontoblastóides sobre os discos de dentina

Células da linhagem MDPC-23 (*Mouse Dental Papilla Cells*) 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 UI/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 3 dias para obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento. Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO DO BRASIL Ind. Com. de Equipam. Ltda, Campinas, SP, Brasil).

Para a realização dos testes de citotoxicidade, os discos de dentina foram montados em novos dispositivos pulparem in vitro, diferentes dos utilizados para a determinação da permeabilidade dentinária. Antes desse procedimento, a superfície dentinária oclusal foi ligeiramente desgastada com uma lixa de carbeto de silício 600 por 10 segundos somente para a formação de uma nova *smear layer*, simulando dessa forma a condição clínica. Em seguida, as câmaras pulparem com o disco de dentina em posição foram embaladas individualmente e esterilizadas por meio de gás de óxido de etileno (Acecil Central de Esterilização Comercial Ltda, Campinas, SP, Brasil).

Trinta mil células da linhagem MDPC-23 em meio de cultura DMEM completo foram plantadas sobre o lado pulpar dos discos de dentina, correspondente a área delimitada por anéis de silicone (0,28 cm²). As câmaras pulparem foram colocadas em placas de 24 wells (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) em posição invertida por 48 horas

para a adesão das células na superfície da dentina. O conjunto foi mantido em atmosfera umedecida de 5% de CO₂, na temperatura de 37°C durante todas as etapas do cultivo. Decorridas as 48 horas de cultura, as câmaras pulpares foram revertidas para que os procedimentos adesivos fossem realizados sobre o lado oclusal dos discos.

Soluções para solvatação da dentina e adesivos experimentais

A dentina coberta com *smear layer* foi, para todos os discos, condicionada com ácido fosfórico 35% (Scotchbond Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 segundos. Em seguida, a superfície foi abundantemente lavada pelo mesmo tempo com água destilada esterilizada e o excesso removido por meio de secagem com bolinha de algodão estéril, de tal forma que a dentina foi mantida úmida. Sobre a dentina condicionada foram aplicados 20 µL de cada uma das seguintes soluções: água destilada ou etanol (100%). As soluções foram mantidas passivamente sobre a dentina por 60 segundos e o excesso removido com bolinha de algodão estéril a fim de obter uma superfície úmida.

Quatro adesivos experimentais (R2, R3, R4 e R5) com conhecida hidrofília foram investigados. A composição e os parâmetros de solubilidade Hoy para os adesivos estão apresentados na Tabela 1. O adesivo R2 é similar ao componente hidrófobo não solvatado utilizado em sistemas adesivos convencionais de 3 passos ou em sistemas autocondicionantes de 2 passos. R3 representa a composição básica de um sistema adesivo convencional simplificado e R4 e R5 contém derivados do ácido carboxílico e fosfórico, respectivamente, representando sistemas adesivos autocondicionantes simplificados.

Duas camadas de cada adesivo experimental foram aplicadas. Cinco microlitros (5 µL) de cada adesivo foram inicialmente depositados sobre a dentina e mantidos sob leve agitação

por meio de um *microbrush* por 10 segundos. Em seguida novos 5 µL foram aplicados. Todos os adesivos foram fotoativados por 20 segundos por meio de um aparelho de luz halógena (Optilux 500, Kerr Company, Orange, CA, EUA), previamente avaliado quanto a intensidade de luz emitida, com um radiômetro (510 ± 10 mW/cm²).

Todos os procedimentos adesivos foram realizados em capela de fluxo laminar vertical para evitar contaminação microbiana, e imediatamente após esses procedimentos, as câmaras pulpares foram novamente armazenadas em estufa de CO₂ por mais 24 horas.

Avaliação do metabolismo celular (Teste MTT)

O metabolismo celular foi avaliado por meio da análise da atividade mitocondrial pela técnica do metiltetrazolium (MTT), a qual detecta a presença da enzima desidrogenase succínica (SDH). Oito dos dez discos inicialmente preparados para cada grupo de investigação foram utilizados para esta análise, 24 h após a aplicação dos adesivos experimentais.

O meio de cultura em contato com as células contendo os produtos da difusão dos adesivos pela dentina foi coletado e colocado em contato com as células para avaliação do tipo de morte celular por meio da citometria de fluxo. Feito isto, os discos foram removidos das câmaras pulpares e posicionados na base de cada compartimento de uma placa de 24 compartimentos (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), com a face pulpar voltada para cima, na qual encontravam-se semeadas as células MDPC-23. Para cada disco foram adicionados 900 µL de DMEM e 100 µL de solução MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-(brometo difeniltetrazolium) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)], numa concentração de 5 mg do sal/mL de PBS. As células foram então incubadas por 4 horas a 37°C em 5% CO₂ e 95%

ar, possibilitando a formação de cristais violáceos produzidos na presença de mitocôndrias ativas (cristais de formazan).

Finalmente, a solução de meio de cultura e sal foi aspirada delicadamente, e então 400 μL de solução de isopropanol acidificada (100 μL de 0,04 N HCl em isopropanol) foram aplicados sobre os discos para dissolver estes cristais. Após homogeneização das soluções e verificação da dissolução dos cristais de formazan, 3 alíquotas de 100 μL de cada amostra, foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) e a coloração azul violácea produzida no meio quantificada por meio de leitor universal de ELISA (Tp Reader; Thermoplate, Nanshan District, Shenzhen, China), equipado com filtro de comprimento de onda de 570 nm. A média aritmética simples foi obtida para os dados de absorbância registrados para cada amostra, sendo que os três primeiros compartimentos da placa foram preenchidos com 100 μL da solução de isopropanol acidificada com HCl a 0,04 N para se determinar o valor correspondente a passagem total da luz, ou seja, valor máximo para a redução do metabolismo celular.

Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise da morfologia celular, os dois discos de dentina restantes para cada grupo foram utilizados. Decorridas 24 horas da aplicação dos adesivos, o meio de cultura foi removido e utilizado para análise em citometria de fluxo. As células foram então fixadas em glutaraldeído 2,5% (1 hora em temperatura ambiente) e em seguida, foram delicadamente lavadas em PBS por 15 min e pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio 1% (OsO_4). Uma nova lavagem com PBS foi realizada e as células foram desidratadas em soluções crescentes de etanol em água (30, 50, 70, 95 e 100%) com trocas a cada 30 minutos, sendo que as duas

últimas concentrações foram repetidas por 2 vezes. Os espécimes foram então secos em 1,1,1,3,3,3 – Hexametyldisilazane 98% (HMDS, ACROS Organics, Morris Plains, NY, EUA) com 3 aplicações de 20 minutos. Após serem mantidos por 24 horas em dessecador, os espécimes foram montados em *stubs* metálicos e cobertos com ouro para análise em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Carl. Zeiss Inc., Oberkochen, Alemanha).

Análise por Citometria de Fluxo

Os experimentos para a análise do tipo de morte celular foram realizados em citômetro de fluxo FACSCanto equipado com laser de argônio e software BD FACSCanto™ Software (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Para a identificação do tipo de morte celular, células MDPC-23 (3×10^4 células/cm²) foram cultivadas em placa de 24 wells (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), permanecendo no interior da incubadora por 48 horas. Em seguida, o meio de cultura padrão foi substituído pelo meio de cultura coletado previamente ao teste de MTT, o qual continha as substâncias difundidas pela dentina provenientes dos adesivos experimentais (eluato). Após 24 horas de contato com esse eluato, as células foram tratadas com tripsina e centrifugadas a 5000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300 µL de tampão de ligação, contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4) cuja composição química possui 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂. Para a aquisição das células marcadas positivamente para apoptose, uma alíquota de 300 µL da suspensão celular de cada condição foi tratada com anexina V (Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brasil) na concentração de 1:500, durante 20 min, no escuro. As amostras foram adquiridas em canal de FL-1 do citômetro de fluxo. A aquisição das células marcadas positivamente para necrose foi realizada imediatamente após a adição de 3 µL de

iodeto de propídio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), na concentração de 100 µg do reagente por mL da solução tampão, sendo adquiridas em canal de FL-2 do citômetro de fluxo. Os dados foram obtidos como porcentagem do número de células marcadas com cada reagente a partir do número total de células MDPC-23 reconhecidas pelo citômetro de fluxo. Para identificação do tipo de morte celular por necrose, um grupo foi incluído para controle interno do método (R+), no qual as células foram colocadas em contato com peróxido de hidrogênio a 29%, durante 30 minutos antes da leitura no citômetro.

Análise do Grau de Conversão Monomérica

O grau de conversão foi determinado utilizando o espectrômetro infravermelho transformado de Fourier (FTIR) (Spectrum 100 Optica; PerkinElmer, MA, EUA), equipado com o dispositivo de reflectância atenuada (ATR), o qual é composto por um cristal horizontal de seleneto de zinco (SeZn) (Pike Technologies, Madison, WI, EUA). O grau de conversão é calculado utilizando padrões previamente estabelecidos [32], baseados na razão entre os picos de 1638 cm⁻¹ (cadeias alifáticas de ligações duplas entre carbonos) e 1608 cm⁻¹ (cadeias aromáticas entre carbonos que originam os anéis benzênicos das moléculas de monômeros, sendo estes utilizados como base, uma vez que sua intensidade permanece inalterada durante o processo de polimerização). Dessa forma, 3 µL de cada sistema adesivo experimental foram aplicados diretamente na face horizontal do cristal, e cobertos com uma tira de poliéster, a fim de impedir a formação da camada inibida de oxigênio. Os gráficos para o cálculo do *baseline* (amostra não polimerizada) foram obtidos previamente a aplicação da luz para todos os espécimes. Em seguida, a fotoativação (510±10 mW/cm², Optilux 500, Kerr Company, Orange, CA, EUA) foi realizada por 10 ou 20 segundos, dando origem ao gráfico representativo dos

valores utilizados no cálculo do grau de conversão. Cinco repetições foram realizadas para cada adesivo e tempo de fotoativação.

Tratamento Estatístico dos Dados

O conjunto de dados de cada variável resposta do estudo (produção da enzima SDH, morte celular por apoptose, morte celular por necrose e grau de conversão monomérica) foi avaliado quanto a aderência a curva normal e homocedasticidade. Como esses requisitos não foram preenchidos, testes não paramétricos de Kruskal-Wallis complementados por testes de Mann-Whitney para comparação dos grupos aos pares foram aplicados, considerando-se os fatores de variação do estudo “sistema adesivo experimental” e “solução de solvatação da dentina” ou “tempo de fotoativação”. O nível de significância de 5% foi utilizado para a decisão estatística.

RESULTADOS

Produção da enzima SDH – teste de MTT

A produção da enzima SDH pelas células MDPC-23, após aplicação dos diferentes sistemas adesivos experimentais sobre a face oclusal de discos de dentina (0,4 mm de espessura) condicionados com ácido fosfórico e solvatados com água ou etanol, está apresentada na Tabela 2. A solvatação da dentina com etanol, sem a aplicação de sistemas adesivos, não exerceu nenhum efeito tóxico sobre as células MDPC-23, uma vez que os valores de metabolismo não diferiram estatisticamente da solvatação com água. Entretanto, quando a dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico foi impregnada por etanol seguido da aplicação dos sistemas adesivos R3 e R4, houve aumento do metabolismo celular em 36,4% e 106,6%,

respectivamente, quando comparado aos valores obtidos para esses mesmos adesivos aplicados sobre a dentina solvatada com água. Nesta condição de solvatação, nenhum dos sistemas adesivos investigados apresentou citotoxicidade as células MDPC-23, uma vez que os valores de metabolismo celular (produção da enzima SDH) não diferiram do controle onde nenhum material foi aplicado. A comparação dos sistemas adesivos experimentais demonstrou diferença significativa entre R2 e R4 para ambas as soluções de solvatação da dentina, com os maiores valores de metabolismo celular observados para R4, enquanto que para R2, os dados obtidos não diferiram do controle.

Tipo de morte celular (apoptose ou necrose)

Morte celular por necrose foi o tipo predominante para todos os sistemas adesivos (Figura 1). Com exceção para o adesivo R3, não houve diferença entre a porcentagem de morte celular por apoptose induzida pelos SAEs quando as soluções de solvatação da dentina foram comparadas (Figura 1a). A porcentagem de morte celular por apoptose variou entre 3 e 10%. Por outro lado, aumento significativo de morte celular por necrose, cujos valores variaram entre 12 e 47%, foi observado para os adesivos R3, R4 e R5 quando a dentina foi previamente solvatada com etanol (Figura 1b).

Análise da morfologia celular (MEV)

Observou-se para o grupo controle (R0) quantidade similar de células para os grupos solvatados com água e etanol, assim como comparável morfologia celular (Figuras 2a e 2a'), típica da linhagem MDPC-23, ou seja, amplo citoplasma com pequenas e múltiplas projeções citoplasmáticas e citoesqueleto achatado. Para o sistema adesivo R2 foi encontrado menor

número de células para o grupo no qual a dentina foi impregnada por etanol (Figura 2b'), sendo que muitas delas apresentavam morfologia arredondada. Quando R3 foi aplicado sobre a dentina solvatada por etanol (Figura 2c') ocorreu a formação de aglomerados celulares resultando na exposição dos túbulos dentinários. Alteração da morfologia celular, assim como descrito para R2, também foi observada para esse adesivo. Em contrapartida, para o adesivo R4, tanto o número como a morfologia das células MDPC-23 foram muito semelhantes para os grupos solvatados com água e etanol (Figuras 3a e 3a'), enquanto que para R5, redução do número celular foi observado, com maior exposição do substrato dentinário quando esse tecido foi solvatado com etanol (Figura 3b').

Grau de conversão monomérica

As porcentagens referentes ao grau de conversão monomérica dos adesivos experimentais fotoativados por 10 ou 20 segundos estão apresentadas na Tabela 3. Em linhas gerais, pode ser dito que um aumento no grau de conversão ocorreu em função do aumento do grau de hidrofília, para ambos os tempos de fotoativação. O coeficiente de correlação (R^2) para os tempos de 10 e 20 segundos foi de 0,95 e 0,96, respectivamente. Dessa forma, houve correlação positiva significativa entre o grau de hidrofília do adesivo experimental e o grau de conversão monomérica. A fotoativação por 20 segundos melhorou significativamente o grau de conversão monomérica de todos os sistemas adesivos experimentais (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Estudos na área de materiais adesivos odontológicos abordam principalmente temáticas como mecanismo de adesão, resistência de união e processo de degradação da interface

adesiva. Entretanto, deve-se ressaltar a importância da análise das propriedades biológicas desses compostos que realizam a união entre o substrato dentinário e o material restaurador, uma vez que podem interferir na saúde e no processo de reparo do tecido pulpar. Em condições clínicas, os monômeros residuais não convertidos em polímeros são capazes de se difundir pela dentina, alcançando assim as células da polpa [24]. As primeiras células a serem afetadas por esses agentes agressores são os odontoblastos, os quais se posicionam em monocamada revestindo externamente o tecido pulpar. Na tentativa de aproximação dos resultados *in vivo/in vitro*, foi utilizado na presente pesquisa um conjunto formado por uma câmara pulpar artificial e um disco de dentina, no qual os procedimentos adesivos foram realizados do lado oclusal e as células odontoblastóides semeadas sobre seu lado pulpar. Essas células ficaram expostas a possibilidade de agressão dos adesivos experimentais por 24 horas, período esse suficiente para a completa difusão dos monômeros pela dentina [33], sendo dessa forma adequado para a análise imediata dos efeitos tóxicos dos materiais testados.

O grau de conversão monomérica foi diretamente influenciado pelo aumento do grau de hidrofília dos adesivos investigados, assim como pelo tempo de fotoativação. Mesmo assim, os maiores valores obtidos (*ca.* 59%), indicam que um grande número de monômeros não convertidos estavam presentes junto ao tecido dentinário. As alterações celulares observadas no presente estudo, relacionadas ao metabolismo e a morfologia celular, podem então ser atribuídas a difusão transdentinária desses monômeros. Sistemas adesivos comercialmente disponíveis apresentam valores de grau de conversão que variam de 20 a 50%, sendo que esta variação ampla é comandada por fatores inerentes a composição dos sistemas adesivos, tipo de luz (halógena ou LED), intensidade (potência do aparelho) e tempo de fotoativação [34-36]. A

reação de polimerização de cada monômero depende da mobilidade e densidade das ligações cruzadas do reagente [20]. Por esse motivo, o aumento da concentração de BisGMA no sistema adesivo aumenta sua viscosidade, resultando na desaceleração da reação e conseqüentemente na diminuição do grau de conversão [37].

O etanol a 100% quando utilizado como solução de solvatação da dentina desmineralizada não apresentou citotoxicidade sobre as células odontoblastóides. Entretanto, aumento significativo de morte celular por necrose foi observado para três dos quatro sistemas adesivos experimentais quando aplicados sobre a dentina solvatada com esse agente ao invés de água. Isso permite inferir, indiretamente, que houve aumento da difusão monomérica transdentinária na presença de etanol. Estudos futuros podem estabelecer quais monômeros foram favorecidos pela solvatação da dentina por esta substância, uma vez que até o presente momento, não existe essa informação na literatura. Existem estudos, entretanto, que tem demonstrado um superior selamento dentinário [38], assim como melhor estabilidade longitudinal da união resina-dentina [16], quando a dentina é impregnada por etanol seguido da aplicação de sistemas adesivos com características hidrófobas. Desde que não houve diferença significativa entre o grau de conversão monomérica para os adesivos R3, R4 e R5, o aumento da porcentagem de morte celular por necrose na presença de etanol não pode ser atribuído somente a difusão de monômeros hidrófobos de alto peso molecular e acentuada toxicidade [39,40], uma vez que R3 continha 70% de BisGMA enquanto que R4 e R5 continham apenas 40% desse monômero.

O metabolismo celular aumentou em 34 e 106%, respectivamente, para os adesivos R3 e R4 quando a dentina foi previamente solvatada com etanol. Apesar do aumento da porcentagem de morte celular por necrose também observado para esses adesivos, esses

achados podem ser explicados pelo fato de que monômeros que compõem os sistemas adesivos, entre eles o BisGMA, TEGDMA e HEMA, possuem a capacidade de liberar moléculas potencialmente bioativas como por exemplo metaloproteinases da dentina (MMPs) [41] e fatores de crescimento que incluem VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) [42]. Essa citocina atua no recrutamento de células indiferenciadas da polpa para o local de injúria, causando um aumento no metabolismo celular, iniciando dessa forma o processo de reparo tecidual frente a uma agressão considerada leve [43,44]. Adicionalmente, os adesivos R4 e R5 eram os únicos que apresentavam pH ácido, *ca.* 4 e 3, respectivamente. Pode ser suposto que, adicionalmente a desmineralização pelo ácido fosfórico, esses sistemas resultaram em desmineralização adicional do tecido dentinário. Quando desmineralizado, o tecido dentinário libera várias proteínas até então aprisionadas pelo envólucro mineral. Colagenases, gelatinases (MMPs) e fatores de crescimento (BMP e TGF- β) são alguns exemplos dessas proteínas. Uma vez liberadas, apresentam potencial de estímulo de funções celulares, como por exemplo, aumento da respiração mitocondrial e da síntese e atividade da fosfatase alcalina, entre outras funções [44].

A microscopia eletrônica de varredura é uma análise descritiva/qualitativa dos espécimes e permite a observação das mudanças nas características fenotípicas da célula, assim como o aumento ou redução do número de células aderidas ao substrato dentinário. Por meio da MEV pode-se ilustrar os resultados obtidos nos testes de viabilidade celular e identificação do tipo de morte, uma vez que algumas células apresentaram alteração de seu citoesqueleto e houve a redução do número celular com aumento da área de dentina exposta quando esse substrato foi solvatado com etanol previamente a aplicação do adesivo.

A identificação do tipo de morte celular é importante na análise da citotoxicidade de sistemas adesivos pois a morte 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 um processo de inflamação tecidual. Em contrapartida, a morte por apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada que pode estar presente não somente durante o desenvolvimento normal, mas também na patologia de algumas enfermidades e agentes tóxicos [45]. A indução de apoptose parece estar associada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), evento principal da resposta celular imediata após exposição a monômeros. Krifka *et al.* afirmaram que monômeros resinosos como o BisGMA, TEGDMA e o HEMA são capazes de interferir com a regulação da produção de citocinas, que diminuem a expressão do antioxidante Glutathione (GSH), aumentando dessa forma os níveis intracelulares de EROs, levando a morte celular por apoptose [46-48]. Outra via que leva a morte celular por apoptose apresenta como principal componente o citocromo C, uma hemoproteína que reside no espaço intermembranoso da mitocôndria, que por sua vez é convertido em peroxidase por meio da geração de EROs. Desse modo, o citocromo C efetua a peroxidação lipídica da fosfatidilserina, induzindo a exposição de sinais de reconhecimento para os macrófagos realizarem a fagocitose dos corpos apoptóticos [49]. Embora morte por apoptose tenha sido detectada para todos os sistemas adesivos, morte celular por necrose foi a mais prevalente. Uma vez que os extratos que ficaram em contato com as células MDPC-23, posteriormente analisadas em citometria de fluxo, continham, além dos monômeros que se difundiram pela dentina, metabólitos e restos celulares das células mortas. Quando a célula morre por necrose libera íons Ca^{2+} e restos celulares que por sua vez podem

induzir a produção de citocinas inflamatórias, as quais, em grandes quantidades, induzem o aumento de morte por necrose.

A dentina apresenta efeito protetor frente a agentes agressores em potencial do tecido pulpar [31,50-51]. Apesar dos resultados do presente estudo terem demonstrado o potencial efeito tóxico dos sistemas adesivos experimentais, esses efeitos podem ser considerados menos severos quando comparados aos efeitos diretos de monômeros resinosos sobre as células odontoblastóides (dados ainda não publicados), uma vez que a barreira dentinária possui a capacidade de atenuar a ação dos componentes dos sistemas adesivos, devido as características intrínsecas do tecido dentinário, como capacidade tampão e condutância hidráulica [52,53]. Assim, o grau de difusão dos monômeros pela dentina é modificado por parâmetros como espessura de dentina remanescente, permeabilidade dentinária e alterações promovidas pelos mecanismos de defesa do complexo dentino-pulpar [54,55].

A solvatação da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico com etanol aumentou a citotoxicidade dos sistemas adesivos investigados, não tendo sido observada uma correlação direta entre esse efeito citopático e o grau de hidrofília do adesivo. A despeito desses resultados desfavoráveis, a metodologia utilizada no presente estudo não permite afirmar que o mesmo comportamento biológico dos adesivos investigados ocorrerá in vivo. Permite apenas prever quais materiais seriam potencialmente mais bem aceitos pelo tecido pulpar, uma vez que na condição in vivo, existem outros fatores de extrema relevância que interferem no mecanismo de defesa e reparação tecidual, como a reação inflamatória, o sistema imunológico e o sistema linfático. Neste contexto, é importante salientar que outros níveis de investigação, como os estudos pré-clínicos e clínicos, sejam considerados para a avaliação da segurança biológica da utilização do protocolo de solvatação da dentina com etanol e sua subsequente

infiltração com monômeros hidrófobos, haja vista que bons resultados quanto a resistência de união e estabilidade longitudinal da união resina-dentina tem sido descritos na literatura [18-20].

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2009/06446-5) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 473453/2009-6) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent*, 2008; 36: 611-617.
2. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etched adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*, 2003; 82: 136-140.
3. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Effects of a peripheral enamel bond on the long-term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water in vitro. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2008; 85: 10-17.
4. Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int*, 1999; 30: 501-507.
5. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res*, 2002; 59: 46-55.

6. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res Part A Appl Biomater*, 2007; 81: 279-286.
7. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res*, 2000; 79: 1458-1463.
8. Eliades G, Vougiouklakis G, Palaghias G. Heterogeneous distribution of single-bottle adhesive monomers in the resin – dentin interdiffusion zone. *Dent Mater*, 2001; 17: 277-283.
9. Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SH. The overwet phenomenon: a scanning electron microscopic study of surface moisture in the acid-conditioned resin-dentin interface. *Am J Dent*, 1996; 9: 109-114.
10. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res*, 2002; 62: 447-456.
11. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*, 2000; 79: 1385-1391.
12. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*, 2004; 83: 216-221.
13. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 2009; 90: 373-380.
14. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res*, 2005; 84: 741-746.

15. Becker TD, Agee KA, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, Tay FR, Pashley DH. Infiltration/evaporation-induced shrinkage of demineralized dentin by solvated model adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007; 80: 156-165.
16. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, Donnelly A, García-Godoy F. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent*, 2007; 20: 7-20.
17. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MRO, Hur YB, Garrett LV, Tay KCY. Bonding BisGMA to dentin - a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res*, 2007; 86: 1034-1039.
18. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, Tay FR. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater*, 2008; 84: 19-29.
19. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res*, 2010; 89: 1499-1504.
20. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, Tay FR, Pashley DH. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater*, 2009; 25: 39-47.
21. Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod*, 1999; 25: 676-682.

22. Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent*, 2003; 28: 440-444.
23. Çetingüç A, Olmez S, Vural N. HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dent Mater*, 2007; 23: 302-307.
24. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2007; 81: 175-184.
25. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*, 2009; 25: 533-543.
26. 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: 592-596.
27. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomater*, 2005; 26: 745-753.
28. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater*, 2007; 23: 34-39.
29. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent*, 2004; 32: 229-234.

30. Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, Schmalz G. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res*, 2011; 90: 257-262.
31. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility; a review. *Dent Mater*, 1996; 12: 186-192.
32. Rueggeberg FA, Craig RG. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. *J Dent Res*, 1988; 67: 932-937.
33. Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater*, 1990; 6: 282-287.
34. Arrais CAG, Pontes FM, Santos LPS, Leite ER, Giannini M. Degree of conversion of adhesive systems light-cured by LED and halogen light. *Braz Dent J*, 2007; 18: 54-59.
35. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 2002; 23: 1819-1829.
36. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I. Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*, 2001; 17: 296-308.
37. Bae JH, Cho BH, Kim JS, Kim MS, Lee IB, Son HH, Um CM, Kim CK, Kim OY. Adhesive layer properties as a determinant of dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005; 74: 822-828.
38. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, Tay FR, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res*, 2009; 88: 146-151.

39. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*, 2009; 10: 3861-3899.
40. About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler WT, Franquin JC. Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dent Mater*, 2005; 21: 156-163.
41. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod*, 2006; 32: 862-868.
42. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mater*, 2006; 22: 434-440.
43. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*, 2000; 28: 77-92.
44. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*, 2010; 98: 2-14.
45. Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*, 2006; 85: 870-877.
46. Krifka S, Petzel C, Hiller KA, Frank EM, Bosl C, Spagnuolo G, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials*, 2010; 31: 2964-2975.

47. Krifka S, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials*, 2011; 32: 1787-1795.
48. 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: 1086-1092.
49. Bayir H, Fadeel B, Palladino MJ, Witasz E, Kurnikov IV, Tyurina YY, Tyurin VA, Amoscato AA, Jiang J, Kochanek PM, DeKosky ST, Greenberger JS, Shvedova AA, Kagan VE. Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1757: 648-659.
50. Schmalz G, Schweikl H, Esch J, Hiller KA. Evaluation of a dentine barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. *J Endod*, 1996; 22: 112-115.
51. Murray PE, García-Godoy C, García-Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2007; 12: 258-266.
52. Abou Hashieh I, Franquin JC, Cosset A, Dejou J, Camps J. Relationship between dentine hydraulic conductance and the cytotoxicity of four dentine bonding resins in vitro. *J Dent*, 1998; 26: 473-477.
53. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod*, 2005; 31: 396-399.
54. Hume WR, Gerzina TM. Bioavailability of components of resin-based materials which are applied to teeth. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1996; 7: 172-179.

55. Mjör IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int*, 2002; 33: 35-63.

56. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, Watson TF, Osorio R. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater*, 2010; 26: 368-379.

Tabela 1. Composição e parâmetros de solubilidade Hoy^a, e o pH dos sistemas adesivos experimentais.

Adesivo	Composição ^a	Parâmetro de solubilidade ADESIVO NÃO SOLVATADO				pH ^b
		δ_d	δ_p	δ_h	δ_t	
R2	70,0% BisGMA 28,5% TEGDMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,9	12,4	6,9	21,2	~ 7
R3	70,0% BisGMA 28,74% HEMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,6	13,0	8,5	22,1	~ 7
R4	40,0% BisGMA 30,0% TCDM 28,75% HEMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	16,2	13,5	9,0	23,0	~ 4
R5	40,0% BisGMA 30,0% BisMP 28,75% HEMA 1,0% EDMAB 0,25% CQ	15,1	13,5	11,1	23,1	~ 3

^a Cadenaro *et al.* [20] Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid etched dentin.

^b Sauro *et al.* [56] Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding.

ABREVIATURAS: BisGMA= 2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloylpropoxy)]-phenyl propane; TEGDMA= triethyleneglycol dimethacrylate; HEMA= 2-hydroxyethyl methacrylate; TCDM= di(hydroxyethylmethacrylate)ester of 5-(2,5-dioxotetrahydrofurfuryl)-3-methyl-3-cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid; CQ=camphoroquinone; EDMAB=2-ethyl dimethyl-4-aminobenzoate; BisMP= Bis[2-(methacryloyloxy)ethyl] phosphate

Tabela 2. Produção da enzima desidrogenase succínica (SDH, densidade óptica) pelas células MDPC-23, detectada pelo teste de metiltetrazolium (MTT), quando da aplicação dos diferentes sistemas adesivos experimentais sobre discos de dentina com 0,4 mm de espessura, após a solvatação da dentina desmineralizada pelo ácido fosfórico com água ou etanol.

Sistema adesivo experimental	Solução de solvatação da dentina	
	Água	Etanol
R0 (controle)	0,307 (0,240-0,397) ^{*a, AB}	0,272 (0,221-0,342) ^{a, B}
R2	0,261 (0,181-0,296) ^{a, B}	0,290 (0,277-0,332) ^{a, B}
R3	0,282 (0,264-0,328) ^{b, AB}	0,375 (0,315-0,495) ^{a, AB}
R4	0,393 (0,317-0,495) ^{b, A}	0,562 (0,371-0,657) ^{a, A}
R5	0,310 (0,268-0,353) ^{a, AB}	0,359 (0,313-0,395) ^{a, AB}

* Valores representam medianas (percentil 25-percentil 75), n=8.

^{A,a} Letras minúsculas permitem comparações nas linhas, enquanto que letras maiúsculas permitem comparações nas colunas. Grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$). R0 = controle, sem aplicação de sistema adesivo; R2-R5 = sistemas adesivos experimentais em ordem crescente de hidrofília.

Tabela 3. Grau de conversão monomérica (%) dos sistemas adesivos experimentais fotoativados por 10 ou 20 segundos.

Adesivo experimental	Tempo de fotoativação	
	10 segundos	20 segundos
R2	50,0 (49,8-50,0) ^{* b, B}	52,7 (51,7-52,8) ^{a, A}
R3	53,7 (53,6-53,7) ^{b, AB}	55,7 (55,6-55,7) ^{a, A}
R4	56,5 (56,2-56,5) ^{b, A}	58,5 (58,4-58,6) ^{a, A}
R5	56,1 (56,1-56,4) ^{b, A}	58,9 (58,6-59,5) ^{a, A}

* Valores representam a mediana (percentil 25-percentil 75), n=5.

^{A,a} Letras minúsculas permitem comparações nas linhas enquanto que letras maiúsculas nas colunas. Medianas identificadas por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$). R2-R5 = sistemas adesivos experimentais em ordem crescente de hidrofília.

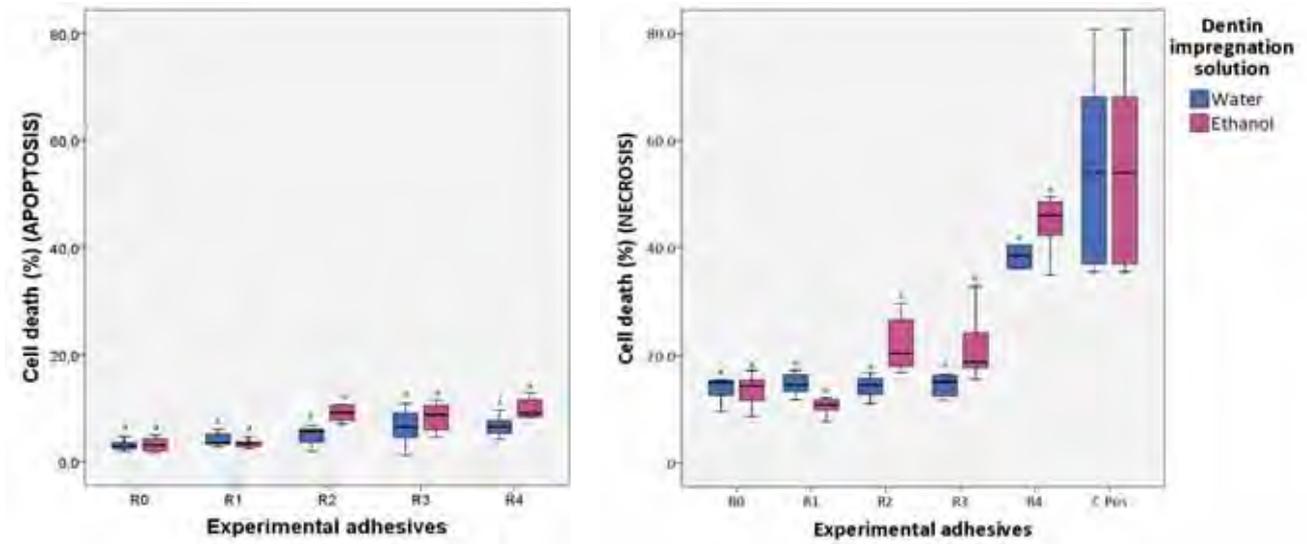


Figura 1. Porcentagem de morte das células MDPC-23 (a) por apoptose (% de células marcadas pela anexina V) e (b) por necrose (% de células marcadas pelo iodeto de propídio, PI) em função da solução de solvatação da dentina desmineralizada e dos adesivos experimentais aplicados sobre essa dentina. Para ambos os gráficos, letras permitem a comparação do mesmo adesivo em relação a solução de solvatação, sendo que letras iguais indicam ausência de diferença estatística (Mann-Whitney, $p < 0,05$). C Pos = controle positivo, peróxido de hidrogênio 29%. R0 = controle, sem aplicação de sistema adesivo; R2-R5 = sistemas adesivos experimentais em ordem crescente de hidrofília.

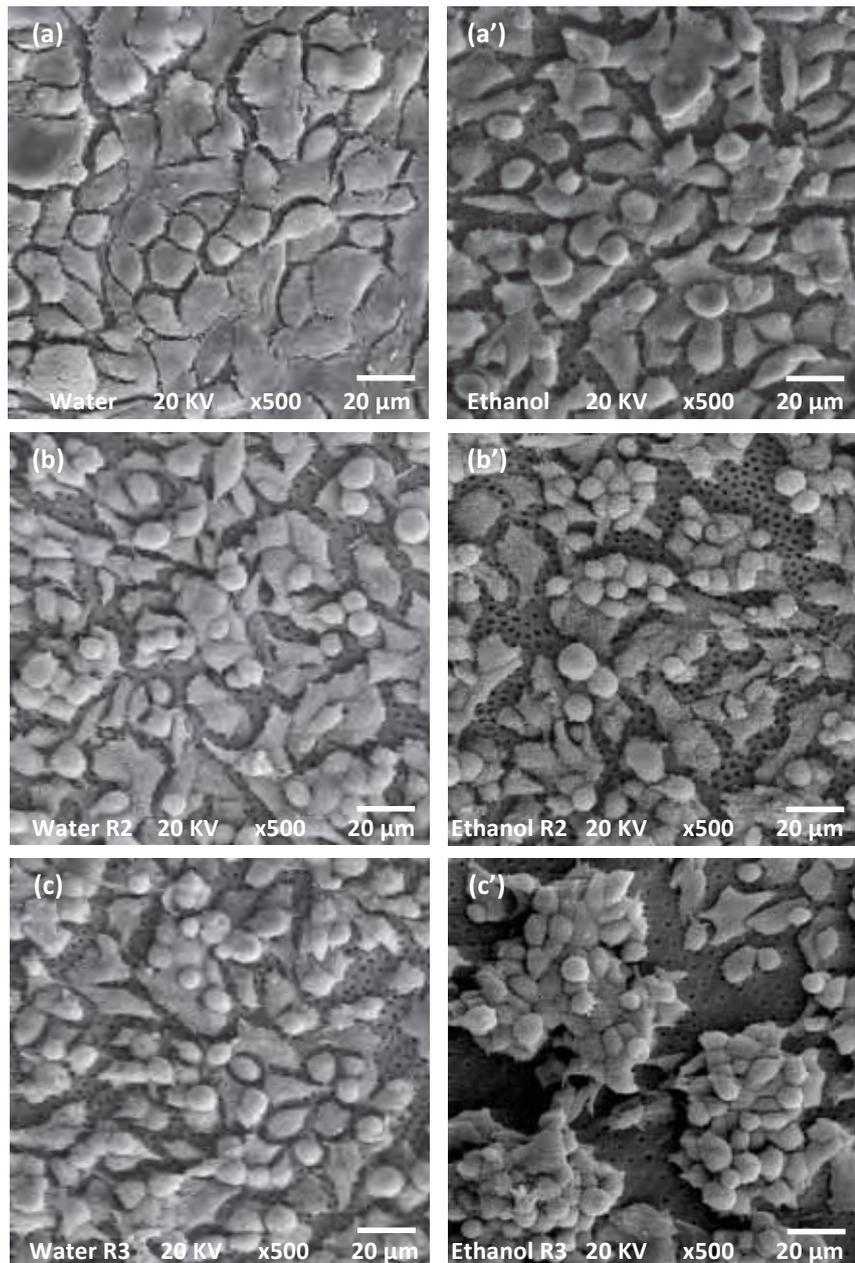


Figura 2. Fotomicrografias em MEV representativas de células MDPC-23 sobre discos de dentina solvatados por água (coluna da esquerda) ou etanol (coluna da direita), previamente a aplicação dos sistemas adesivos experimentais. (a) e (a') Controle, sem aplicação de sistema adesivo. Morfologia típica das células MDPC-23, ou seja, amplo citoplasma com numerosas e pequenas projeções citoplasmáticas e citoesqueleto achatado recobrendo a grande maioria da superfície de dentina; (b) e (b') aplicação do adesivo R2. Redução do número e alteração da morfologia celular, para o grupo solvatado com etanol; (c) e (c') aplicação do adesivo R3. Quando utilizado etanol, observa-se a formação de aglomerados de células que passaram a apresentar morfologia arredondada, com conseqüente exposição do substrato dentinário. x500.

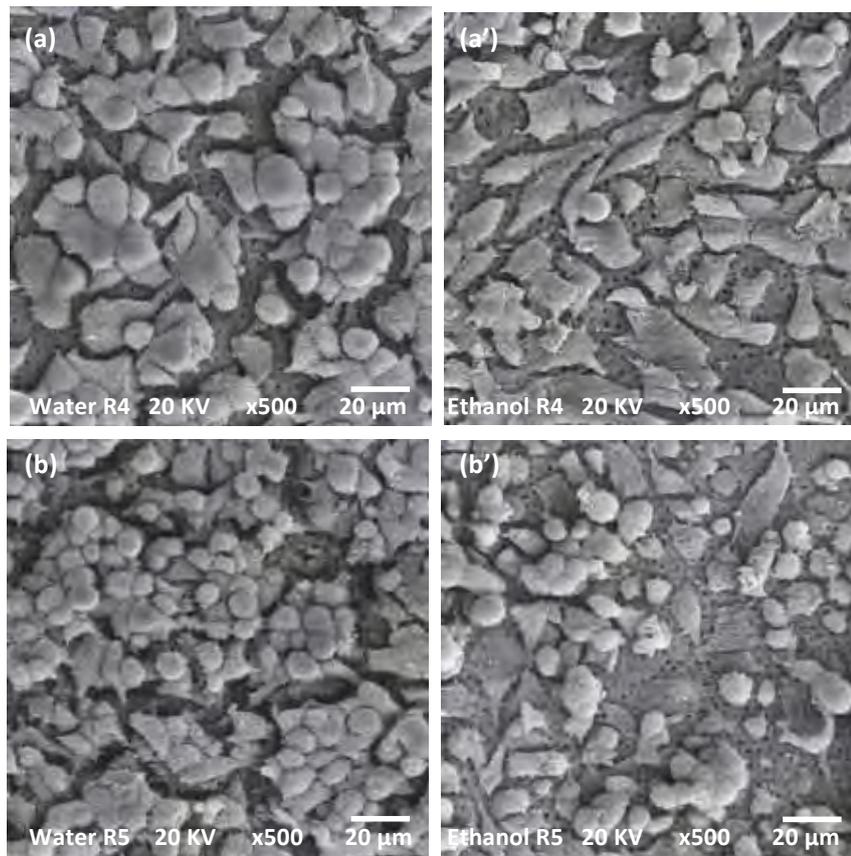


Figura 3. Fotomicrografias em MEV representativas de células MDPC-23 sobre discos de dentina impregnados por água (coluna da esquerda) ou etanol (coluna da direita) previamente a aplicação dos sistemas adesivos. (a) e (a') Aplicação do adesivo R4. Redução do número celular para os espécimes onde a dentina foi solvatada com etanol, porém com preservação da morfologia das células que permaneceram aderidas ao substrato; (b) e (b') aplicação do adesivo R5. Redução do número e alteração da morfologia celular para os espécimes tratados com etanol. x500.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL



DISCUSSÃO GERAL

A constatação de que a união resina-dentina sofre deterioração gradual^{4,7,13,15} e, portanto, que não é capaz de promover retenção e selamento que garantam a funcionalidade das restaurações adesivas em longo prazo, tem motivado uma série de investigações com o objetivo comum de encontrar protocolos clínicos que eliminem ou minimizem os efeitos negativos responsáveis por esta instabilidade longitudinal³⁷.

Um dos fatores que dificultam a produção de uma união resina-dentina previsível, segura e estável é a característica intrinsecamente úmida da dentina, a qual, por sua vez, determina que a composição dos sistemas adesivos seja compatível com essa umidade²⁵. Entretanto, polímeros formados a partir de monômeros hidrófilos, além de resultarem em membranas permeáveis a passagem de fluídos^{3,16}, são os mais susceptíveis a ação deletéria da água (degradação hidrolítica)^{36,45}.

A técnica úmida com etanol (*ethanol-wet bonding*) visa a modificação temporária da condição hidrófila inerente a dentina para uma condição hidrófoba^{6,52}. Assim, uma vez que esse agente promove contração mínima da matriz de colágeno, seria possível a permeação dos espaços interfibrilares por monômeros hidrófobos, resultando na formação de uma camada híbrida menos susceptível a sorção de água e subsequente plastificação do componente polimérico^{35,40}. Entretanto, tem sido demonstrado que monômeros hidrófobos, com inerente peso molecular mais elevado, como BisGMA (MW 512 g/mol) e UDMA (MW 470 g/mol), apresentam também maior toxicidade celular⁵. Portanto, a problematização da presente dissertação, baseou-se no fato de que, por favorecer a infiltração dentinária de monômeros

hidrófobos, a solvatação da dentina por etanol após a desmineralização do substrato pelo condicionamento ácido também poderia aumentar a citotoxicidade dos sistemas adesivos.

Em ambos os experimentos (capítulos 1 e 2), não foi observada uma relação direta entre o grau de hidrofília do sistema adesivo e sua citotoxicidade. Se fosse possível isolar apenas essa característica, poderia ser dito que sistemas adesivos mais hidrófobos não são, necessariamente, mais tóxicos. Entretanto, para que os diferentes graus de hidrofília fossem conseguidos, sistemas adesivos com distintas composições tiveram que ser manipulados, fato este que impediu a análise do grau de hidrofília como único fator responsável pelo efeito citopático dos materiais investigados. Outras características como pH e viscosidade, muito provavelmente, também interferiram na citotoxicidade dos sistemas adesivos^{20,27,39,51,56}.

No capítulo 1, foi investigado o contato direto dos componentes lixiviados dos sistemas adesivos com as células alvo. Como células alvo foram utilizadas células imortalizadas da linhagem MDPC-23, por apresentarem funções celulares representativas daquelas exercidas por odontoblastos, as primeiras células a sofrerem os efeitos citopáticos promovidos por componentes liberados de materiais odontológicos e difundidos transdentinariamente. A metodologia empregada neste capítulo representa um desafio extremo as células e os resultados obtidos permitem uma análise preliminar e puramente comparativa da citotoxicidade dos materiais teste. Pode ser previsto que um material que exerça baixo efeito tóxico neste tipo de metodologia, apresente uma aceitável compatibilidade biológica para aplicação in vivo. Isso pode ser considerado, por exemplo, para os sistemas adesivos R2 e R3, os quais reduziram o metabolismo celular em apenas 3,1% e 0,2%, respectivamente, sendo não diferentes do grupo controle.

A interposição de discos de dentina entre as células alvo e os materiais teste visa mimetizar *in vitro* as condições clínicas nas quais esses materiais são utilizados. Assim, no capítulo 2, discos de dentina com 0,4 mm de espessura foram empregados, uma vez que já está demonstrado na literatura que um remanescente mínimo de dentina de 0,5 mm seria suficiente para promover proteção ao tecido pulpar frente a produtos tóxicos advindos de materiais restauradores²⁹.

Os resultados do capítulo 2 ratificam o efeito protetor que o tecido dentinário exerce frente a chegada de produtos tóxicos ao tecido pulpar, mais especificamente, as células de linhagem odontoblástica. O sistema mais hidrófilo do capítulo 1 (R5), considerado como um dos mais tóxicos, foi considerado não citopático no capítulo 2 (R5), ou seja, comparável ao efeito do grupo controle onde nenhum sistema adesivo foi aplicado.

Também no capítulo 2, o protocolo de pesquisa utilizado permitiu investigar o efeito da solvatação da dentina com etanol sobre a citotoxicidade dos diferentes sistemas adesivos experimentais. Pôde ser observado que na presença de etanol ocorreu aumento de morte celular por necrose para três dos quatro sistemas testados (R3, R4 e R5). Entretanto, é interessante destacar que para o sistema adesivo mais hidrófobo (R2), o mesmo efeito negativo da solvatação da dentina com etanol não foi observado. Desta forma, assim como no capítulo 1, não foi determinada no capítulo 2 uma relação direta entre o grau de hidrofília e a citotoxicidade do sistema adesivo, sendo o efeito citopático desses materiais determinado por um conjunto de propriedades, entre elas, pH, composição e grau de conversão monomérica.

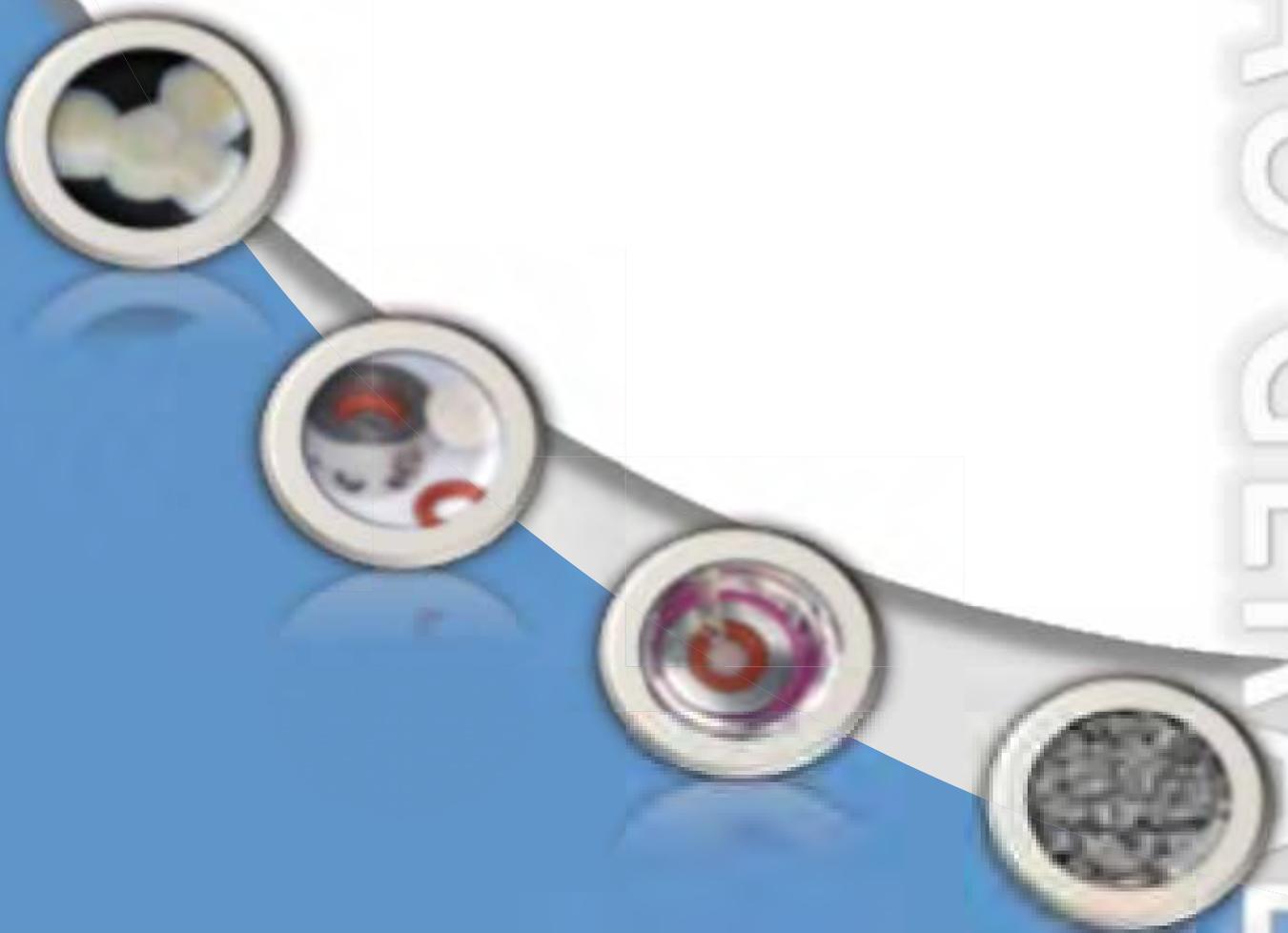
Necrose foi o tipo predominante de morte celular, variando de 18% a 47%. O aumento significativo da porcentagem de morte celular por necrose induzida por componentes advindos

dos sistemas adesivos demonstra, indiretamente, que a solvatação da dentina com etanol favoreceu a difusão transdentinária desses componentes. Uma vez em contato com as células alvo, esses componentes são capazes de induzir alterações metabólicas, como redução da síntese proteica, da atividade da fosfatase alcalina e da respiração mitocondrial (capítulo 1). Entretanto, baseado nos resultados de metabolismo celular observados para os adesivos R3 e R4 do capítulo 2, onde ocorreu aumento da síntese da enzima desidrogenase succínica, pode ser sugerido que, quando em quantidades toleráveis pelas células alvo, monômeros resinosos podem afetar positivamente o metabolismo das células sobreviventes^{24,55}.

A despeito dos resultados desfavoráveis observados no capítulo 2, a metodologia aplicada não permite afirmar o comportamento biológico dos adesivos investigados quando aplicados *in vivo*, pois nesta condição outros fatores extremamente importantes intervêm na reparação tecidual e no mecanismo de defesa do organismo, incluindo os sistemas imunológico e linfático, além da reação inflamatória. Dessa maneira, esses resultados permitem somente prever quais materiais seriam potencialmente mais bem aceitos pelo tecido pulpar. Neste contexto, uma vez que têm sido demonstrados na literatura bons resultados quanto as propriedades mecânicas desses sistemas adesivos, como alta resistência de união e estabilidade longitudinal da união resina-dentina^{10,47-48}, é importante salientar que outros níveis de investigação, como os estudos pré-clínicos e clínicos, sejam considerados para a avaliação da segurança biológica da utilização do protocolo de solvatação da dentina com etanol e sua subsequente infiltração com monômeros hidrófobos.

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL



CONCLUSÃO GERAL

Com base nos modelos experimentais desenvolvidos no presente estudo, e nos resultados obtidos, foi possível concluir que os sistemas adesivos experimentais foram citopáticos as células MDPC-23 quando em contato com as mesmas na forma de extrato. Entretanto, na presença de dentina, interposta entre os materiais e as células alvo, esse efeito citopático foi reduzido.

Não foi possível individualizar o efeito do grau de hidrofília sobre a citotoxicidade dos sistemas adesivos, assim, pode ser sugerido que outros fatores como pH, composição e grau de conversão monomérica também exercem ação sobre a propriedade biológica desses materiais. De maneira geral, não foi observada relação direta entre o grau de hidrofília e a toxicidade dos sistemas adesivos sobre células MDPC-23.

Necrose foi o tipo mais frequente de morte celular, sendo que a solvatação da dentina com etanol favoreceu a ocorrência desse evento indesejável para três dos quatro sistemas adesivos investigados. Assim sendo, pôde ser indiretamente inferido que a utilização da técnica úmida de adesão com etanol (*ethanol-wet bonding*) promoveu a maior infiltração da dentina por monômeros resinosos quando comparada com a técnica úmida de adesão convencional utilizando água como solução de solvatação da dentina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS REFERÊNCIAS REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

1. Abdalla AI, Feilzer AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent.* 2008; 36: 611-7.
2. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2002; 63: 418-23.
3. Albaladejo A, Osorio R, Toledano M, Ferrari M. Hybrid layers of etch-and-rinse versus self-etching adhesive systems. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15: 112-8.
4. Amaral FL, Colucci V, Palma-Dibb RG, Corona SA. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. *J Esthet Restor Dent.* 2007; 19: 340-53.
5. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci.* 2009; 10: 3861-99.
6. Becker TD, Agee KA, Joyce AP, Rueggeberg FA, Borke JL, Waller JL, et al. Infiltration/evaporation-induced shrinkage of demineralized dentin by solvated model adhesives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 80: 156-65.
7. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater.* 2008; 24: 90-101.

*. De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater.* 2010; 26: 571-8.
9. Cadenaro M, Breschi L, Antonioli F, Navarra CO, Mazzoni A, Tay FR, et al. Degree of conversion of resin blends in relation to ethanol content and hydrophilicity. *Dent Mater.* 2008; 24: 1194-200.
10. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol-saturated acid-etched dentin. *Dent Mater.* 2009; 25: 39-47.
11. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent.* 2009; 37: 108-14.
12. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent.* 2004; 17: 104-8.
13. Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent.* 2005; 18: 315-9.
14. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86: 90-4.
15. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86: 529-33.

16. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Carvalho RM, Hosaka K, et al. Membrane permeability properties of dental adhesives films. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2009; 88: 312-20.
17. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90: 373-80.
18. Çetingüç A, Ölmez S, Vural N. HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dent Mater.* 2007; 23: 302-7.
19. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials.* 2005; 26: 745-53.
20. Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent.* 2003; 31: 223-9.
21. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 81: 175-84.
22. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2003; 82: 136-40.
23. Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent.* 2008; 36: 1068-73.

24. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin–pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010; 98: 2-14.
25. Finer Y, Santerre JP. The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater*. 2004; 69: 233-46.
26. Franz A, König F, Lucas T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. *Dent Mater*. 2009; 25: 232-9.
27. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod*. 2005; 31: 396-9.
28. Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, et al. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res*. 2011; 90: 257-62.
29. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *J Oral Pathol*. 1988; 17: 396-403.
30. Hashimoto M, Fujita S, Endo K, Ohno H. Effect of dentinal water on bonding of self-etching adhesives. *Dent Mater*. 2009; 28: 634-41.
31. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials*. 2003; 24: 3795-803.
32. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. 2000; 79: 1385-91.

33. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod.* 1999; 25: 676-82.
34. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84: 741-6.
35. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshiyama M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of resin-dentin bonds to water- vs. ethanol-saturated dentin. *J Dent Res.* 2009; 88: 146-51.
36. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiuf C, et al. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials.* 2005; 26: 6449-59.
37. Jacobsen T. Resin composites in minimally invasive dentistry. *Oral Health Prev Dent.* 2004; 2 (suppl 1): 307-11.
38. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent.* 2004; 32: 229-34.
39. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25: 533-43.
40. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater.* 2006; 22: 973-80.

41. Mantellini MG, Botero PY, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res.* 2003; 82: 592-6.
42. Pashley DH, Agee KA, Wataha JC, Rueggeberg FA, Ceballos L, Itou K, et al. Viscoelastic properties of demineralized dentin matrix. *Dent Mater.* 2003; 19: 700-6.
43. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 83: 216-21.
44. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From dry to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *Am J Dent.* 2007; 20: 7-21.
45. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater.* 2007; 23: 1164-72.
46. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Effects of a peripheral enamel bond on the long-term effectiveness of dentin bonding agents exposed to water in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008; 85: 10-7.
47. Sadek FT, Braga RR, Muench A, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Ethanol wet-bonding challenges current anti-degradation strategy. *J Dent Res.* 2010; 89: 1499-504.
48. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater.* 2008; 84: 19-29.

49. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-Kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater.* 2007; 23: 34-9.
50. Santerre JP, Shajii L, Leung BW. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12: 136-51.
51. Schmalz G, Schuster U, Kosh A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod.* 2002; 28: 188-92.
52. Tay FR, Pashley DH, Kapur RR, Carrilho MRO, Hur YB, Garrett LV, et al. Bonding BisGMA to dentin – a proof of concept for hydrophobic dentin bonding. *J Dent Res.* 2007; 86: 1034-39.
53. Theilig C, Tegtmeier Y, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater.* 2000; 53: 632-9.
54. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998; 77: 1622-9.
55. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 28: 77-92.

56. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88: 558-78.

57. Vajrabhaya L, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent.* 2003; 28: 440-4.

58. Yoshii, E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res A Appl Biomater.* 1997; 37: 517-24.

59. Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009; 1: 163-76.

APÊNDICE

APÊNDICE APÊNDICE APÊNDICE APÊNDICE



Ilustrações da metodologia do Capítulo 1

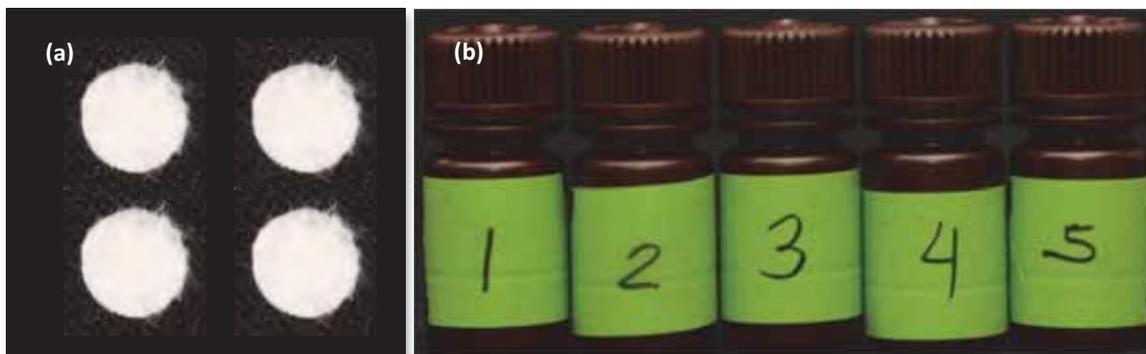


Figura 1. (a) Discos de papel filtro com 5 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura; (b) sistemas adesivos experimentais, em ordem crescente de hidrofília, utilizados na presente pesquisa.

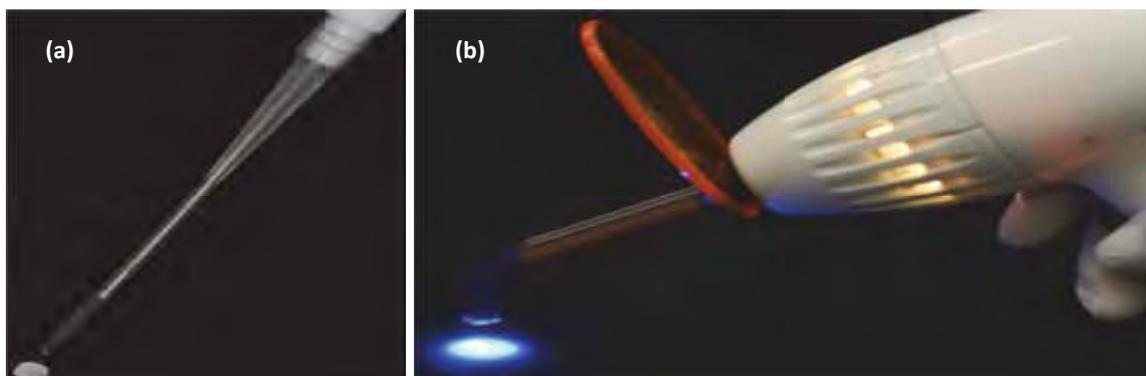


Figura 2. (a) Aplicação de 10 μ L de cada sistema adesivo experimental testado; (b) fotoativação por 10 segundos com aparelho de luz halógena.

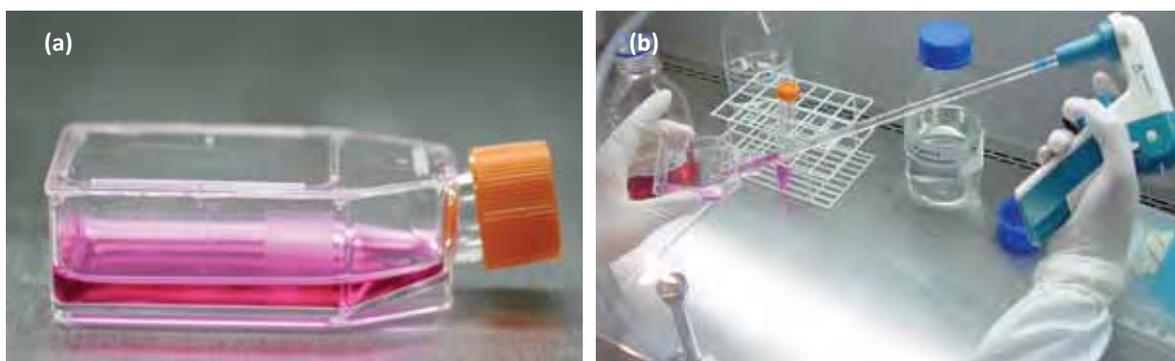


Figura 3. (a) e (b) Cultivo das células odontoblastóides MDPC-23 em garrafas plásticas, até atingirem o número suficiente para a realização do estudo.

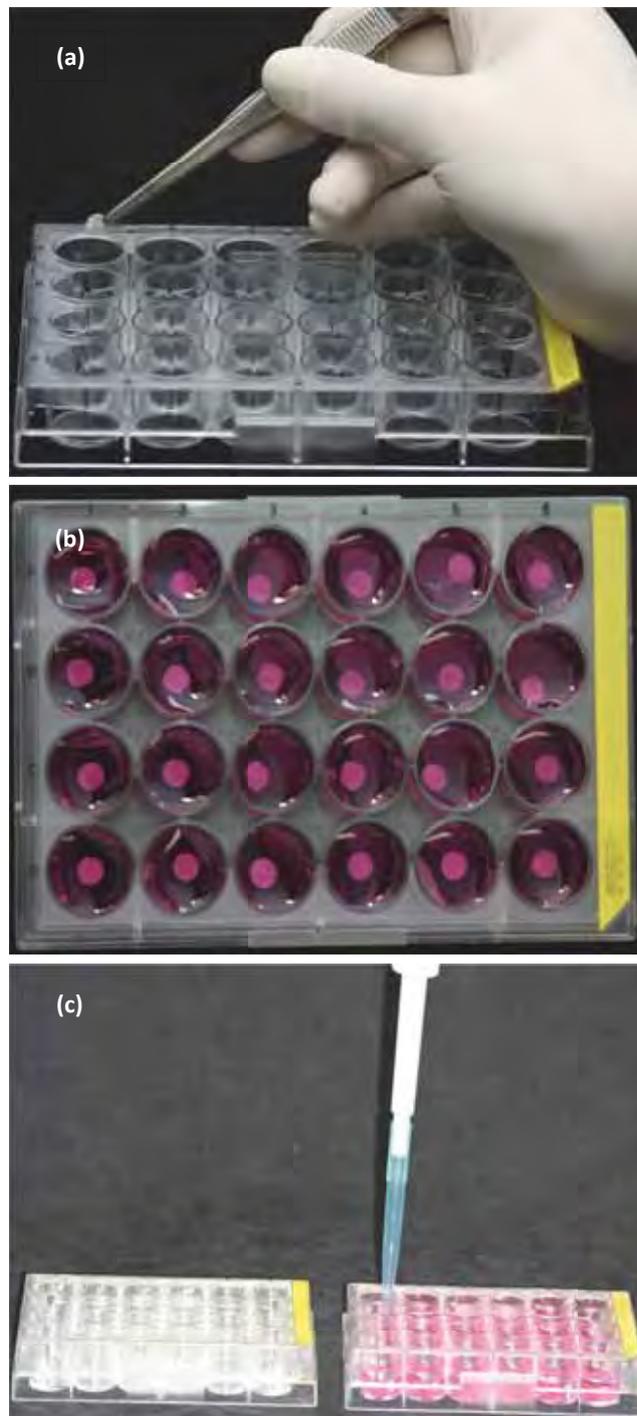


Figura 4. (a) Colocação dos discos de papel impregnados com os SAEs em cada compartimento de uma placa de 24 compartimentos; (b) compartimentos contendo os discos de papel impregnados e preenchidos com 1 mL de meio de cultura DMEM não suplementado com SFB; (c) após 24 horas, o extrato obtido (DMEM + componentes liberados pelos SAEs) foi colocado em contato com as células MDPC-23 por mais 24 horas.

Ilustrações da metodologia do Capítulo 2



Figura 5. (a) Dentes terceiros molares humanos hígidos selecionados para o experimento 2; (b) dente fixado em placa de madeira com auxílio de godiva.



Figura 6. (a) Primeiro corte com o disco de diamante, paralelo e a 2 mm aquém da JAC; (b) inspeção da presença da projeção dos cornos pulpares com auxílio de sonda exploradora; (c) segundo corte realizado a 0,5 mm do primeiro para a obtenção do disco de dentina com essa espessura.

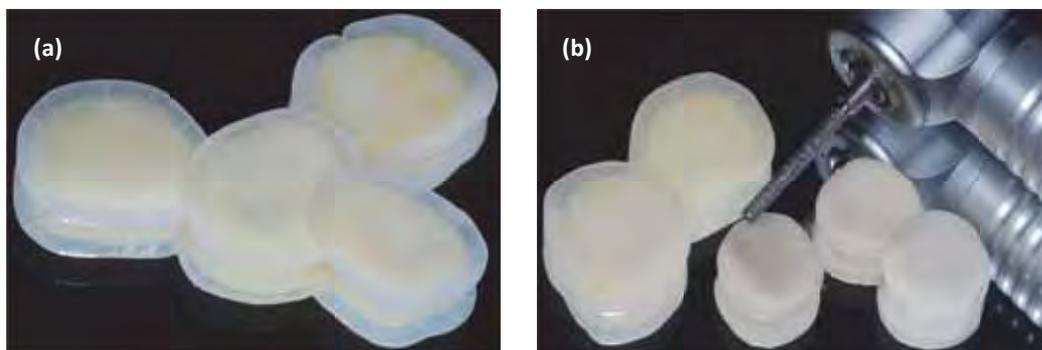


Figura 7. (a) Discos selecionados para realização do experimento 2; (b) redução dos discos de dentina (8 mm de diâmetro) com auxílio de alta rotação e broca diamantada cilíndrica para posterior adaptação dos mesmos na câmara pulpar in vitro.

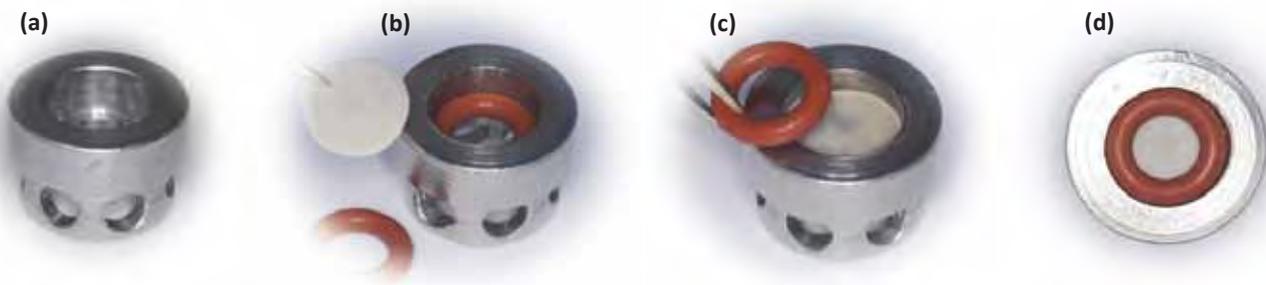


Figura 8. (a) Câmara pulpar in vitro (*in vitro pulp chamber – IVPC*); (b) e (c) posicionamento do disco de dentina na IVPC, entre os anéis de silicone; (d) aspecto final do conjunto constituído pelo disco de dentina e a IVPC.



Figura 9. (a) IVPC posicionada de modo invertido no compartimento da placa; (b) preenchimento do compartimento com 1 mL de DMEM para possibilitar o plantio das células MDPC-23; (c) plantio das células odontoblastóides na face pulpar do disco de dentina.

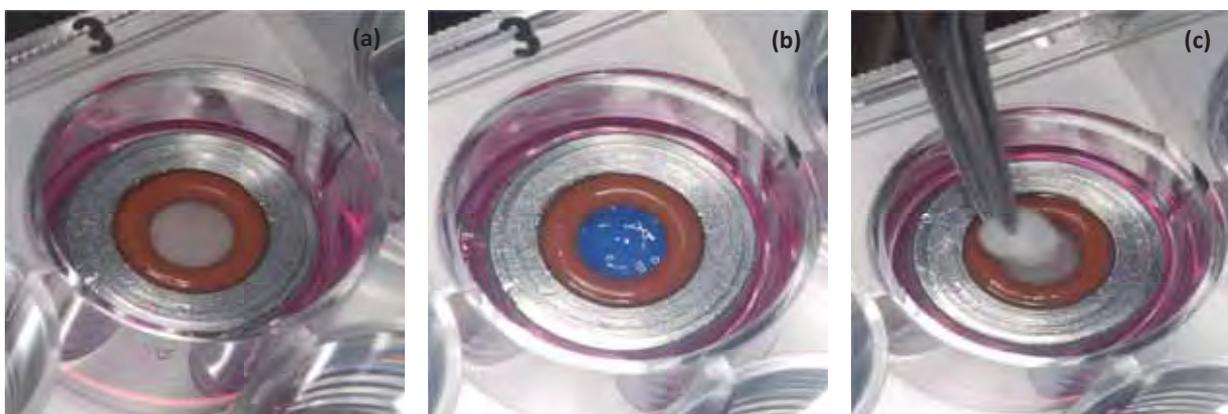


Figura 10. (a) IVPC revertida com a face oclusal para cima; (b) aplicação de ácido fosfórico por 15 segundos; (c) remoção do excesso de umidade após lavagem do ácido fosfórico.

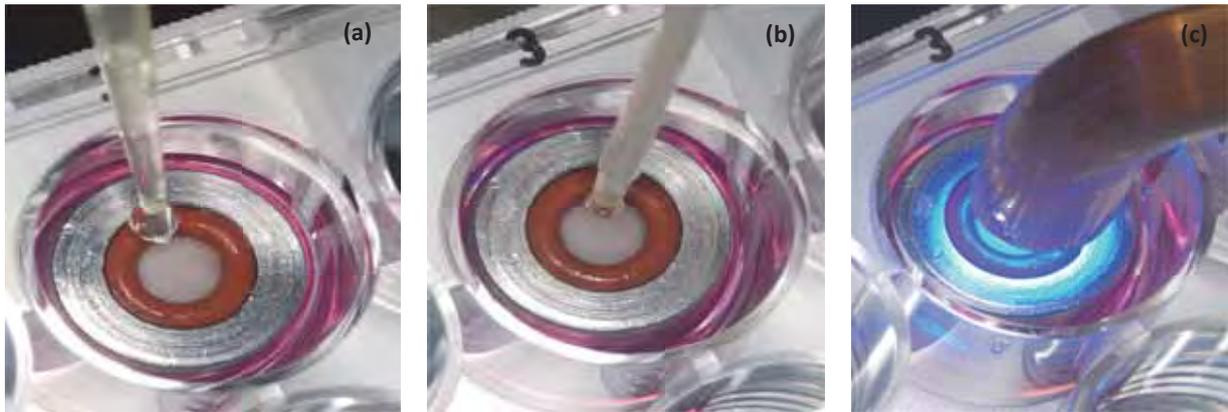


Figura 11. (a) Aplicação de solução para solvatação da dentina (água destilada ou etanol); (b) aplicação do sistema adesivo experimental após nova remoção do excesso de umidade; (c) fotoativação por 20 segundos.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “*CITOTOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DE SISTEMAS ADESIVOS COM DIFERENTES GRAUS DE HIDROFILIA APLICADOS SOBRE A DENTINA IMPREGNADA POR ETANOL*”, sob o protocolo nº 25/09, de responsabilidade do Pesquisador (a) *JOSIMERY HEßLING*, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled “*TRANSDENTINAL CITOTOXICITY OF ADHESIVE SYSTEMS OF DIFFERENT HYDROPHILICITY APPLIED ON ETHANOL-IMPREGNATED DENTIN*”, protocol number 25/09, under Dr. *JOSIMERY HEßLING*, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethics Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 02 (two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 30 de junho de 2009.

Prof. Dr. Mirian Aparecida Onofre
Coordenadora



Author Guidelines

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials

Information for Contributors

Aims and Scope

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials is an official journal of the Society for Biomaterials, the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials. It is a peer-reviewed journal serving the needs of biomaterials professionals who devise, promote, apply, regulate, produce, and market new biomaterials and medical devices. Papers are published on device development, implant retrieval and analysis, manufacturing, regulation of devices, liability and legal issues, standards, reviews of different device areas, and clinical applications. Published manuscripts fit into one of six categories: original research reports, clinical device-related articles, short research and development reports, review, special report, or columns and editorials. Manuscripts from all countries are invited but must be in English. Authors are not required to be members of a Society for Biomaterials.

Types of Articles Considered for Publication

Original Research Reports: Full-length papers consisting of complete and detailed descriptions of a research problem, the experimental approach, the findings, and appropriate discussion. Findings should represent significant new additions to knowledge.

Clinical Device-Related Articles: Full-length papers addressing such issues as material processing, device construction, regulatory matters, clinical trials, and device retrieval.

Reviews: Scholarly and critical topic-oriented reviews that present a state-of-the-art view. While most reviews are solicited, persons interested in contributing may contact the Editor.

Special Reports: Reports of special topic-oriented symposia, device retrieval protocols, or other special reports not described in the above categories, yet of interest to the applied biomaterials research and development community. Potential contributors should contact the Editor before submitting special reports.

Columns and Editorials: While columns and guest editorials are preponderantly solicited, persons interested in becoming columnists or contributing editorials are encouraged to contact the Editor.

Submission of Manuscripts

Online Submission: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>.

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>. Check for an existing user account. If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account. Follow all instructions.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support using the GetHelp Now link in the right corner of any screen.

Upon Acceptance: Manuscript files will now automatically be sent to the publisher for production. It is imperative that files be in the correct format to avoid a delay in the production schedule. Copyright Transfer Agreements must be mailed to the Journal Administration Office immediately upon acceptance at the following address: Ms. Lisa Brodsky, Assistant Managing Editor, JBMR c/o John Wiley & Sons, Inc., 111 River Street (MS 8-02), Hoboken, NJ 07030-5774. *JBMR Part B* has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to their submitted articles. The Editorial Board asks authors of original reports and reviews to disclose, at the time of submission: (1) any financial or employment arrangements they may have with a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or with a company making a competitive product; and (2) any grants or contracts from a government agency, a nonprofit foundation, or a company supporting the preparation of the manuscript or the described research. This information will be available to the reviewers of the manuscript. If the article is accepted for publication, the editor will discuss with the authors the manner in which such information may be communicated to the reader.

At the time of submission, *JBMR Part B* asks authors to certify that all animals utilized in their research were cared for according to the policies and principles established by the Animal Welfare Act and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Review Process: All original reports and reviews receive critical review by at least two reviewers with expertise in the major subject area of the paper. Reviewers may recommend "Acceptance as is," "Acceptance with modification," or "Rejection." If modification is required, the manuscript is returned to the author(s). The revised manuscript is then re-reviewed by the original reviewers, and even re-revised if necessary. Differences in opinion are resolved by submission either to a third reviewer or the Editor.

Organization and File Formats

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. The results and discussion sections must be written separately and cannot be combined. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as LaTeX. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for the reviewers.

Original research and short reports should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1. Abbreviations must conform to those listed in Council of Biology Editors' CBE Style Manual, 5th Edition.

When mentioning a material, chemical reagent, instrument, or other product, use the generic name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is absolutely required, list it in parentheses.

Title Page: List the full title of the paper and each author's full name (first name, middle initial(s), surname), department, institution, city, and state (and country if other than the United States). Indicate the name and address of the author to whom reprint requests should be sent.

Abstract and Keywords: Include an abstract of about 200 words maximum summarizing the aims, findings, and conclusions of the paper. Below the abstract, list five keywords or phrases that best characterize the subject matter of the manuscript.

Running Heads: Supply a short title of no more than 65 characters, including spaces and punctuation, to be used for running head copy.

References: Wiley's Journal Styles Are Now in EndNote. EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search

bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly format your bibliography in any Wiley journal style. To download the reference style for this journal, or to purchase a copy of EndNote, go online to wileyonlinelibrary.com/jendnotes.

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit www.endnote.com/support

Number references consecutively as they appear in the text. Material accepted for publication but not yet published may be listed in the References, but unpublished observations, personal communications, and material submitted for publication but not yet accepted should be cited parenthetically within the text (and not included among the numbered references). Style references entries using the Council of Biology Editors Style Manual, 5th Edition formats:

For journal articles: Alexander A, Green WS. Total hip replacements: A second look. *J Soc Biomater* 1989;45:345–366.

For books/chapters: Ricci JL, Guichet J-M. Total hip replacement: A third look. Cindra AB, Franklin DE, editors. *State of the art orthopaedics*, vol 3, Hips. New York: Wiley; 1988:56–59.

For abstracts: Davidson GRH. Total hip replacement: A fifth look. *Trans ABCS* 1987;22:341–345.

For presentations: Goodenough T. Total hip replacement: A sixth look. Presented at the 3rd Annu Mtg Orthop Res Soc, Boston, December 5–7, 1989.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool.)

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution:

The minimum requirements for resolution are: 1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs. 300 DPI/PPI for picture-only photographs. 600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows. These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

Note that these file formats are not acceptable for printing: JPG, GIF, PNG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEGs and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figure files, authors are encouraged to visit <http://cjs.cadmus.com/da/applications.asp>.

To ensure that your digital graphics are suitable for print purposes, please go to RapidInspector™ at <http://rapidinspector.cadmus.com/zwj/index.jsp>. This free, stand-alone software application will help you to inspect and verify illustrations right on your computer.

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file.

Color Illustrations: Color figures are generally printed in the Journal at the author's expense. The publisher will provide cost estimates prior to printing. A limited number of color figures that are of critical importance and that significantly enhance the presentation will be considered for publication at the publisher's expense subject to editorial recommendation. Final decision on publication of color figures will be at the discretion of the Editor. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Reprints: Reprints may be ordered at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=JEMB>.

Note to NIH Grantees:

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.



Dental Materials

Official Publication of the Academy of Dental Materials

Guide for Authors

Authors are requested to submit their original manuscript and figures via the online submission and editorial system for Dental Materials. Using this online system, authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process. Please register at: <http://ees.elsevier.com/dema>.

Dental Materials now only accepts online submissions.

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on www.elsevier.com/artworkinstructions. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

Manuscripts

The journal is principally for publication of Original Research Reports, which should preferably investigate a defined hypothesis. Maximum length 6 journal pages (approximately 20 double-spaced typescript pages) including illustrations and tables.

Systematic Reviews will however be considered. Intending authors should communicate with the Editor beforehand, by email, outlining the proposed scope of the review. Maximum length 10 journal pages (approximately 33 double-spaced typescript pages) including figures and tables.

Three copies of the manuscript should be submitted: each accompanied by a set of illustrations. The requirements for submission are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", *Annals of Internal Medicine*, 1977,126, 36-47. All manuscripts must be written in American English. Authors are urged to write as concisely as possible.

The Editor and Publisher reserve the right to make minimal literary corrections for the sake of clarity. Authors for whom English is not the first language should have their manuscripts read by colleagues fluent in English. If extensive English corrections are needed, authors may be charged for the cost of editing. For additional reference, consult issues of *Dental Materials* published after January 1999 or the Council of Biology Editors Style Manual (1995 ed.).

All manuscripts should be accompanied by a letter of transmittal, signed by each author, and stating that the manuscript is not concurrently under consideration for publication in another journal, that all of the named authors were involved in the work leading to the publication of the paper, and that all the named authors have read the paper before it is submitted for publication.

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety.

Manuscripts not conforming to the journal style will be returned. In addition, manuscripts which are not written in fluent English will be rejected automatically without refereeing.

Format

General

- number all pages consecutively.
- type double-spaced on A4 or 8.5 x 11-inch bond paper, with margins of 30 mm.

- double-space references.
- indent or space paragraphs.
- arrange article in the following order: Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables, Figures, Captions.
- start each section on a separate page.

Title page

- Title (capitalize the first letter of the first word) e.g. Comparison of the color stability of ten new composites.
- Authors (first name, middle initial, surname) e.g. Kenneth J. Anusavice 1, Victoria Marker 2
- Authors' addresses (abbreviated) e.g.
1 Department of Biomaterials, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
2 Department of Biomaterials Science, Baylor College of Dentistry, Dallas, Texas, USA
- Short Title (45 characters) e.g. Color stability of composites
- Corresponding Author details (essential): Name, complete address, phone, fax, and E-mail numbers

Abstract (structured format)

- 250 words or less.
- subheadings should appear in the text of the abstract as follows: Objectives, Methods, Results, Significance. (For Systematic Reviews: Objectives, Data, Sources, Study selection, Conclusions). The Results section may incorporate small tabulations of data, normally 3 rows maximum.

Keywords

Up to 10 keywords should be supplied e.g. dental material, composite resin, adhesion.

Introduction

This must be presented in a structured format, covering the following subjects, although actual subheadings should not be included:

- succinct statements of the issue in question;
- the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue (reference);
- the aims and objectives of the research being reported relating the research to dentistry, where not obvious.

Materials and methods

- describe the procedures and analytical techniques.
- only cite references to published methods.
- include at least general composition details and batch numbers for all materials.
- identify names and sources of all commercial products e.g.
"The composite (Silar, 3M Co., St. Paul, MN, USA)..."
"... an Au-Pd alloy (Estheticor Opal, Cendres et Metaux, Switzerland)."
- specify statistical significance test methods.

Results

- refer to appropriate tables and figures.
- refrain from subjective comments.
- make no reference to previous literature.
- report statistical findings.

Discussion

- explain and interpret data.
- state implications of the results, relate to composition.
- indicate limitations of findings.
- relate to other relevant research.
- suggest directions for future research.

Conclusion (if included)

- must NOT repeat Results or Discussion
- must concisely state inference, significance, or consequences

Acknowledgements

As appropriate, e.g.:

"Based on a thesis submitted to the graduate faculty, University of Virginia, in partial fulfilment of the requirements for the M.S. degree."

"This investigation was supported in part by Research Grant DE 00000 from the National Institute of Dental Research, Bethesda, MD 20892."

References - must now be given according to the following numeric system:

Cite references in text in numerical order. Use square brackets: in-line, not superscript e.g. [23]. All references must be listed at the end of the paper, double-spaced, without indents. For example:

1. Moulin P, Picard B and Degrange M. Water resistance of resin-bonded joints with time related to alloy surface treatments. J Dent, 1999; 27:79-87.
2. Taylor DF, Bayne SC, Sturdevant JR and Wilder AD. Comparison of direct and indirect methods for analyzing wear of posterior composite restorations. Dent Mater, 1989; 5:157-160.

Avoid referencing abstracts if possible. If unavoidable, reference as follows:

3. Demarest VA and Greener EH . Storage moduli and interaction parameters of experimental dental composites. J Dent Res, 1996; 67:221, Abstr. No. 868.

Tables and figures

All tables and figures must be thoroughly discussed in the text of the manuscript.

Tables

- one table to a page, each with a title.
- number tables in order of mention using Arabic numerals.
- must be able to "stand alone" apart from text.
- when appropriate, standard deviations of values should be indicated in parentheses; (do NOT use \pm notation).
- results of statistical analysis must be included, use superscript letters to indicate significant differences.
- for explanatory footnotes, use symbols (*, #, **, ##).

Figures

- Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. Images to be supplied separately in jpg, gif or other graphics file.
- only black and white photographs for print publication.
- omit titles and other information contained in the figure caption.
- maximum of 6 figures per manuscript.
- figures grouped together should have similar dimensions and be labelled "a, b, c", etc.
- place magnification markers directly on the micrographs.
- authors should consider that the majority of figures will be reduced to the width of a single column (approximately 85 mm). Preferably figures should exactly match, or be no more than 1.5 times that width.
- authors can indicate if they feel a figure should be full page width.

Dental Materials has been selected for inclusion in a new 'colourful e-products' workflow. Figures that appear in black and white in the printed version of the journal can be IN COLOUR, online, in ScienceDirect. Authors wishing to make use of this

facility should ensure that 1. the artwork is in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and at the correct resolution 2. RGB colour space is used and 3. for colour online and black and white in print, both colour and black and white artwork (file and/or hardcopy) is provided. There will be no charges to the authors for colour figures online.

Graphs

- unique, concise axis labels; do not repeat the Figure caption.
- uniform size for graphs of similar type.
- type size that will be easily read when the graph is reduced to one column width.
- lines that are thick and solid (100% black).

Captions to tables and figures

- list together on a separate page.
- should be complete and understandable apart from the text.
- include key for symbols or abbreviations used in Figures.
- individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.

General Notes on Text

Abbreviations and acronyms: terms and names to be referred to in the form of abbreviations or acronyms must be given in full when first mentioned.

Correct Usage

- use S.I. units (International System of Units). If non-SI units must be quoted, the SI equivalent must immediately follow in parentheses.
- use correct symbols for μ , L (as in μm , mL, etc.)
- put leading zeros in all numbers less than 1.0
- write out number of ten or fewer (ten rats) except when indicating inanimate quantities (10 mL)
- always use digits for dates, dimensions, degrees, doses, time, percentages, ratios, statistical results, measurements, culture cells, and teeth.
- the complete names of individual teeth must be given in the text.

General Policy

- receipt of manuscripts will be acknowledged.
- after initial review, authors will be notified of status.
- every effort is made to obtain timely reviews; please remember that the referees and the editor are volunteers.
- a list of revisions and responses to reviewers' critiques must accompany resubmitted revised manuscripts.

On Submission: Agreement, by the act of ticking a box, to the statement, "This paper has been compiled with the knowledge, input and approval of all the named authors."

On acceptance, authors will be required to sign a transfer of copyright agreement. If figures, tables, or other excerpts, are included from copyrighted works the author is responsible for obtaining written permission from the copyright holder prior to submitting the final version of the paper. Full credit must be given to such sources.

Offprints and page charges: no page charges are levied on articles published in Dental Materials. Each corresponding author receives 25 offprints of their article free of charge after it has been published; they will also have the opportunity to order additional copies.

Submission Package Checklist:

- letter of transmittal signed by all authors.
- one electronic copy of the manuscript.
- one electronic copy of each image and table, all labelled.

For further guidance on electronic submission, please contact Author Services, Log-In Department, Elsevier Ltd, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK. E-mail: authors@elsevier.co.uk, fax: +44 (0) 1865 843905, tel: +44 (0) 1865 843900.

© Copyright 2011 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 19 de dezembro de 2011.

LUCIANA BIANCHI