



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



Fernanda Ali Kitagawa

**Efeito citotóxico transdentinário, grau de conversão e resistência de união à
dentina de cimentos resinosos fotoativados**

Araraquara

2021



**UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara**



Fernanda Ali Kitagawa

Efeito citotóxico transdentinário, grau de conversão e resistência de união à dentina de cimentos resinosos fotoativados

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Reabilitação Oral

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2021

K62e	Kitagawa, Fernanda Ali Efeito citotóxico transdentinário, grau de conversão e resistência de união à dentina de cimentos resinosos fotoativados / Fernanda Ali Kitagawa. -- Araraquara, 2021 89 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Carlos Alberto de Souza Costa 1. Citotoxicidade. 2. Cimentos de resina. 3. Dentina. 4. Odontoblastos. I. Título.
------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Fernanda Ali Kitagawa

Efeito citotóxico transdentinário, grau de conversão e resistência de união à dentina de cimentos resinosos fotoativados

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Turrioni Hidalgo

3º Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

Araraquara, 11 de agosto de 2021

DADOS CURRICULARES

Fernanda Ali Kitagawa

NASCIMENTO	16/05/1994 - Barretos - São Paulo
FILIAÇÃO	Roberto Kitagawa Sada Abo Alli
2014-2019	Graduação em Odontologia pela da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2019-2020	Estágio de Docência em Patologia Bucal pela Faculdade Odontologia de Araraquara – UNESP
2019-2021	Pós-graduação em Reabilitação Oral pela Faculdade Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Aos meus pais, Roberto e Sada,

pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos da minha vida. Vocês são a plenitude do amor, do afeto e do amparo; chama que mantém acesa a perseverança, sorriso à cada conquista obtida, regaço para transpor cada percalço encontrado pelo caminho. Se hoje, estou concretizando sonhos, saibam que são vocês o meu alicerce, a minha base. Obrigada por todos os sacrifícios e esforços que concederam a mim e aos meus irmãos uma vida de amor e alegria. Vocês são meu porto seguro e devo tudo a vocês; amor para além da Eternidade.

Aos meus irmãos, Eduardo, Henrique e Daniel,

gratidão por serem meus maiores parceiros e amigos; por serem ouvidos, guardados, abraços, empatia e conselhos. Dividir a minha vida com vocês é uma alegria imensurável. Estaremos sempre juntos. Amo vocês!

Às minhas Avós Natalina e Izabel.

À minha Batiam e Vovó (in memoriam), por estarem comigo desde os meus primeiros dias, meus tombos, trocas de dentes e aniversário, amparando sem medir esforços, num carinho traduzido por histórias de vida, iguarias, blusas de lã e trocadinhos para comprar lanches. As senhoras são mulheres fortes e batalhadoras e agradeço a cada uma pelo amor e cuidado para com seus filhos e netos.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por me receber de braços abertos no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais. Tenho profundo respeito e admiração pelo senhor, desde a graduação, onde aprendi o que é ser um pesquisador íntegro. Obrigada por me fornecer meios e suporte durante todo o desenvolvimento da minha pesquisa e, além disso, por todo esforço e tempo a mim dedicados. Sinto orgulho por ser sua orientanda. Ao senhor, minha eterna gratidão.

À minha co-orientadora, **Maria Luísa de Alencar e Silva Leite**, por estar presente durante todas as etapas dessa jornada. Malu me recebeu com muito carinho, pegou em minha mão em diversos momentos e sempre, com muita educação e amor, muito me ensinou! Sou extremamente grata por tudo que fez e faz por mim; sem você, o caminho percorrido seria, certamente, muito mais difícil. Me espelho em você.

À **Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling**, por sua enriquecedora contribuição ao trabalho. Obrigada pelo importante papel que teve durante minha formação como cirurgiã-dentista e durante a pós-graduação. Agradeço imensamente toda sua educação, delicadeza e maestria, a senhora é um exemplo para mim!

À **Prof^a. Dr^a. Fernanda Gonçalves Basso**, pelo tempo despendido para contribuir com meu trabalho, por toda dedicação e ensinamentos que recebi de você.

Ao **Prof. Dr. Gelson Luis Adabo**, por todas as contribuições prestadas durante o desenvolvimento da minha pesquisa. Obrigada pela disposição e dedicação que sempre demonstra!

Ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, obrigada pelo conhecimento compartilhado, por sua disponibilidade e todas as contribuições durante o desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos meus amigos, **Marlon Dias, Beatriz Voss, Igor Mendes Soares, Caroline Anselmi, Rafael Ribeiro, Uxua e Maria Luísa**, que sempre, muito solícitos, me apoiaram e ajudaram durante todos os momentos em que precisei. A convivência com vocês tornou meus dias no laboratório mais felizes e leves. Obrigada pelas risadas, cafés, brincadeiras e ombro amigo quando necessário. Carrego vocês no meu coração!

Aos **membros e amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**, Taisa Pansani, Isabela Souza, Maria Luísa, Igor Mendes Soares, Marlon Dias, Beatriz Voss, Caroline Anselmi, Rafael Ribeiro, Uxua Zuta, Laís Cardoso e Larissa Mito, nos bons e maus momentos. Esse mútuo apoio tornou a jornada muito mais prazerosa e leve. Admiro e aprendo todos os dias com vocês, obrigada!

Aos **amigos da turma de Mestrado** em Odontologia, área de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Cesar, Suellen, Isabela, Marlon, Marina, Amanda Ferro, Maydson, Bruno, Igor, Amanda Brandão, Mariana, Thaís e Juliana.

À família **Kitagawa e Abon Ali**, meus tios, tias, primos e primas. Não sou nada sem minha família, minha eterna e plena gratidão a vocês. Vocês tornam a minha jornada mais linda e tranquila. Há muito amor entre nós!

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representado pelo digníssimo Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos e pela Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia.

Aos **Coordenadores do Programa de Pós-Graduação Odontologia**, área de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Coordenador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli e pelo Vice-Coordenador Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri.

Aos **Docentes Programa de Pós-Graduação Odontologia**, área de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais** do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Coordenador Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde a maior parte desta pesquisa foi realizada.

Ao **Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Coordenadora Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling, onde uma parte deste projeto desenvolvido.

Ao **Laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química – Unesp**, representado pelo Coordenador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, onde uma parte desta pesquisa foi realizada.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Kitagawa FA. Efeito citotóxico transdentinário, grau de conversão e resistência de união à dentina de cimentos resinosos fotoativados [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade transdentinária (CT), o grau de conversão (GC) e a resistência de união (RU) à dentina de cimentos resinosos fotoativados diretamente ou através de facetas cerâmicas (FC) com 1 mm de espessura. Células odontoblastóides MDPC-23 foram cultivadas sobre a superfície pulpar de discos de dentina adaptados em câmaras pulpares artificiais e em compartimentos de placas de acrílico. Os seguintes procedimentos foram realizados na superfície oclusal dos discos: CN- controle negativo (sem tratamento); SB- Single Bond Universal; TN- Tetric N-Bond Universal; AU- Ambar Universal APS; RV- RelyX Veneer; VE- Variolink Esthetic LC; AV- Allcem Veneer APS; RV+FC; VE+FC; AV+FC. Todos os materiais foram usados de acordo com as recomendações de seus fabricantes. A viabilidade (AlamarBlue assay) e morfologia (MEV) das células aderidas aos discos foi avaliada, e os extratos (meio de cultura + componentes dos materiais que se difundiram pela dentina) foram coletados e imediatamente aplicados sobre as células previamente cultivadas nas placas de 96 compartimentos. As células foram avaliadas quanto a viabilidade (Live-Dead assay), adesão e espalhamento (AE; F-actina), atividade de fosfatase alcalina (ALP, Timolftaleína) e formação de nódulos de mineralização (NM; Alizarin Red). O pH dos extratos obtidos de cada material foi determinado ao longo de 24 horas. O GC do topo e base de cada amostra fotoativada diretamente ou através da faceta foi avaliado por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Para o teste de RU, a dentina condicionada com ácido fosfórico foi hibridizada com os sistemas adesivos relacionados com os respectivos cimentos resinosos, os quais foram fotopolimerizados diretamente ou através da FC. Os dados de CT, GC e RU foram submetidos ao teste ANOVA, complementado pelo pós-teste de Tukey ($\alpha=5\%$). De maneira geral, em todos os grupos onde os materiais resinosos foram usados, com exceção do grupo RV, foi observado redução da viabilidade, AE, bem como menor atividade de ALP e formação de NM em comparação ao CN ($p<0,05$). Os grupos onde o sistema adesivo AU foi usado isoladamente ou em associação com o cimento AV, apresentaram os maiores efeitos deletérios para as células MDPC-23. O pH dos materiais não influenciou a citotoxicidade. A interposição da FC entre a fonte de luz e os materiais resultou em menor GC. Não foi determinada diferença de RU à dentina para todos os cimentos resinosos avaliados, independente da interposição ou não da FC ($p>0,05$). De acordo com a metodologia empregada neste estudo, foi possível concluir que o cimento RV, associado ao sistema adesivo SB causou o menor efeito tóxico transdentinário sobre as células pulpares MDPC-23. A interposição de FC entre a fonte de luz e os cimentos resinosos não aumentou a CT ou interferiu na RU destes materiais à dentina, porém reduziu o GC.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Cimentos de resina. Dentina. Odontoblastos.

Kitagawa FA. Transdental cytotoxicity, degree of conversion and bond strength of light-cured resin cements to dentin [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the transdental cytotoxicity (TC), degree of conversion (DC), and bond strength (μ SBS) to dentin of light-cured resin cements, which were photoactivated or not through 1 mm thick ceramic veneer (CV). MDPC-23 odontoblast-like cells were seeded on the pulpal surface of dentin discs adapted to artificial pulp chambers and in acrylic plate compartments. The following procedures were performed on the occlusal surface of the discs: NC- negative control (no treatment); SB- Single Bond Universal; TN- Tetric N-Bond Universal; AU- Ambar Universal APS; RV- RelyX Veneer; VE- Variolink Esthetic LC; AV- Allcem Veneer APS; RV+CV; VE+CV; AV+CV. All dental materials were used according to manufacturer's recommendations. The viability (AlamarBlue assay) and morphology (SEM) of the cells adhered to the discs was assessed and the extracts (culture medium + components that diffused through the dentin discs) were collected and immediately applied on previously seed cells in 96-well plates. The cells were evaluated concerning their viability (Live-Dead assay), adhesion and spreading (AS; F-actin), alkaline phosphatase activity (ALP; Timolphthalein) and mineralized nodules formation (MN; Alizarin Red). The pH of the extracts obtained from each material was determined over 24 hours. The DC of the top and bottom of each light-cured sample photoactivated directly or through the CV was evaluated by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR). For the microshear bond strength testing, acid-conditioned dentin was hybridized with the adhesive systems related to their respective resin cements, which were light-cured directly or through CV. The TC, DC and μ SBS data were analyzed by ANOVA, complemented by the Tukey post-test ($\alpha=5\%$). Overall, in those groups in which the resinous materials were used, except the RV group, reduced the viability, adhesion and spreading of cells, as well as lower ALP activity and MN formation was observed in comparison with NC ($p<0.05$). The use of AU adhesive system associated or not with AV cement produced the greatest adverse effects for MDPC-23 cells. The pH from the materials did not influence the cytotoxicity. The interposition of CV between the light source and the resin cements resulted in lower DC. Concerning the μ SBS to dentin, no statistical difference was observed for all resin cements, regardless the interposition or not of the CV ($p>0.05$). According to the methodology used in this in vitro study, one can conclude that the RV cement, associated with the SB adhesive system, caused the least transdental toxic effect to the odontoblast-like MDPC-23 cells. The interposition of the CV between the light source and the resin luting cements did not interfere with the TC and μ SBS of these materials to dentin, however it reduced the DC.

Keywords: Cytotoxicity. Resin cements. Dentin. Odontoblasts.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	17
2.1 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Citotoxicidade de Monômeros Resinosos	18
3.2 Cimentos Resinosos	24
4 MATERIAL E MÉTODO	31
4.1 Fase 1: Citotoxicidade Transdentinária de Cimentos Resinosos Fotoativados	31
4.1.1 Preparo das facetas cerâmicas	31
4.1.2 Obtenção dos discos de dentina	32
4.1.3 Cultivo das células odontoblastóides MDPC-23	34
4.1.4 Procedimento experimental	35
4.1.5 Viabilidade das células cultivadas na dentina (Alamar Blue).....	40
4.1.6 Viabilidade das células nos compartimentos (Live/Dead).....	40
4.1.7 Adesão e espalhamento celular (F-actina).....	41
4.1.8 Avaliação da morfologia celular (MEV)	41
4.1.9 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	41
4.1.10 Deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red)	43
4.1.11 Análise de pH.....	43
4.2 Fase 2: Avaliação do Grau de Conversão	44
4.2.1 Procedimento experimental	44
4.3 Fase 3: Resistência de União à Dentina dos Cimentos Resinosos Fotoativados.....	46
4.3.1 Confeção das amostras	46
4.4 Análise Estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Fase 1: Citotoxicidade Transdentinária dos Cimentos Resinosos	50
5.1.1 Viabilidade das células MDPC-23 cultivadas na superfície	

pulpar de discos de dentina (Alamar Blue)	50
5.1.2 Viabilidade das células MDPC-23 cultivadas nos compartimentos das placas de acrílico e expostas aos extratos (Live/Dead)	51
5.1.3 Adesão e espalhamento das células MDPC-23 expostas aos extratos (F-actina).....	53
5.1.4 Avaliação da morfologia das células MDPC-23 cultivadas sobre a superfície pulpar dos discos de dentina (MEV)	55
5.1.5 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	57
5.1.6 Deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red)	58
5.1.7 Análise do pH.....	60
5.2 Fase 2: Avaliação do Grau de Conversão	61
5.3 Fase 3: Resistência de União à Dentina dos Cimentos Resinosos Fotoativados.....	62
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO	88

1 INTRODUÇÃO

A preocupação dos pacientes com as características que definem o padrão estético de seus dentes, fez com que os materiais cerâmicos odontológicos ganhassem evidência, visto que replicar a anatomia e os detalhes dos elementos dentais é um dos principais objetivos da Odontologia Estética Moderna¹. Desde que as facetas laminadas cerâmicas conseguem reproduzir o policromatismo, translucidez e textura dos tecidos dentários, o que pode estabelecer e devolver o sorriso natural e harmônico requerido pelos pacientes, este tipo de material passou a ser bastante usado quando a demanda por resultado estético é alta^{2,3}.

Além de reproduzir as características dos dentes, as peças protéticas também devem ter adequada adesão às estruturas dentárias remanescentes. Desde que estes dois fatores são fundamentais para o sucesso do tratamento estético, torna-se imprescindível o uso clínico de cerâmicas e materiais adesivos de alta qualidade⁴. Por muitos anos, os cimentos resinosos duais, os quais são ativados por reação química e luz, foram a principal escolha dos cirurgiões dentistas, especialmente devido à baixa irradiância das primeiras unidades fotopolimerizadoras disponíveis no mercado⁵. Com o passar do tempo, os cimentos duais perderam espaço, principalmente em decorrência do elevado conteúdo de co-iniciadores à base de amina terciária, o que frequentemente causava alterações na cor das peças protéticas devido a contínua oxidação do material adesivo⁶⁻⁸.

Bragança et al.⁹ relataram que cimentos resinosos ativados exclusivamente por luz são os materiais adesivos mais indicados para cimentação de laminados cerâmicos, pois a delgada espessura da peça protética permite adequada polimerização do cimento subjacente. Além de apresentar ampla gama de cores, esses cimentos fotoativados também proporcionam maior tempo de trabalho, o que facilita a remoção de excessos antes de proceder a polimerização do material⁵. Mais recentemente, pastas de prova (try-in) passaram a ser fornecidas juntamente com os cimentos resinosos fotoativados, de tal forma que o profissional pudesse fazer, em conjunto com seu paciente, a avaliação da tonalidade da faceta cerâmica previamente sua cimentação definitiva¹⁰. Assim, esta categoria de cimentos resinosos tem sido considerada uma ótima opção para uso clínico, particularmente para cimentação de laminados cerâmicos^{5,11}.

O mecanismo de interação dos cimentos resinosos convencionais com a dentina envolve, previamente a sua aplicação, o condicionamento ácido do substrato dentinário. Este procedimento resulta na exposição de fibrilas de colágeno parcialmente desnaturadas, entrelaçadas em meio a túbulos dentinários que passam a exsudar fluído do interior da polpa para a superfície de dentina desmineralizada¹². Neste momento, espera-se que a aplicação do sistema adesivo sobre o substrato dentinário desmineralizado e úmido resulte na formação de uma camada híbrida homogênea e estável. Porém, o limitado grau de conversão monomérica dos sistemas adesivos, o que pode ser agravado pelo excesso de umidade local, faz com que muitos monômeros livres tóxicos não reagidos se difundam pelos túbulos dentinários para causar danos às células pulpares¹³⁻¹⁵. Assim, uma das etapas mais importantes para o sucesso clínico de restaurações indiretas a longo prazo é a adequada fotopolimerização do material cimentante¹⁶. Num trabalho recente, Strazzi-Sahyon et al.¹⁷ relataram que o elevado grau de conversão monomérica promovido pela irradiação emitida pelos aparelhos fotopolimerizadores é essencial para assegurar boas propriedades ópticas e mecânicas, bem como menor agressão ao complexo dentina-polpa. Porém, mesmo em condições ideais, o grau de conversão monomérica não é completo e reações adversas podem ocorrer nos tecidos bucais devido à elevada concentração local de monômeros tóxicos residuais liberados dos materiais resinosos¹⁵.

Durante a instalação de peças protéticas, a polimerização dos cimentos fotoativados pode ser negativamente afetada pela espessura da porcelana, a qual tem potencial para atenuar a intensidade de luz capaz de alcançar o material adesivo^{18,19}. Além do tipo de fotopolimerizador, outros fatores, tais como a presença de oxigênio, distância entre a fonte de luz e o cimento, intensidade e tempo de irradiação, também podem interferir na conversão monomérica de materiais resinosos fotopolimerizáveis²⁰⁻²⁴. A ausência ou atenuação da irradiância capaz de alcançar o material cimentante, também pode ocorrer devido a tonalidade ou baixa translucidez da cerâmica usada na confecção da peça protética²⁵. Assim, é possível considerar que, independente da causa e origem, o excesso de monômeros livres liberados pelos materiais resinosos aplicados sobre a dentina permeável pode tornar os produtos e/ou a técnica de cimentação não biocompatível com o complexo dentina-polpa^{15,26}. Estudos prévios demonstraram que o contato de monômeros com diferentes tipos

celulares causa efeitos tóxicos e genotóxicos, o que pode resultar em graves efeitos teciduais^{14, 27,28}. Muitos pesquisadores já relataram os efeitos citotóxicos de diversos monômeros, tais como o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), bisfenol A-glicidilmetacrilato (Bis-GMA), dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA) e uretano dimetacrilato (UDMA), os quais podem ser encontrados nos adesivos dentinários e cimentos resinosos usados em procedimentos clínicos²⁹⁻³².

Com base nas informações apresentadas até aqui e considerando os limitados dados científicos disponíveis na literatura, torna-se importante, neste momento, avaliar, de maneira objetiva e comparativa, a adesão à dentina e a citotoxicidade transdentinária de diferentes cimentos resinosos fotopolimerizáveis e seus protocolos de aplicação clínica, bem como determinar a possível interferência da faceta cerâmica sobre estas propriedades requeridas para materiais usados na cimentação de peças protéticas. Os resultados obtidos com a completa execução deste estudo, poderão contribuir para a seleção de cimentos resinosos capazes de fornecer maior segurança de aplicação clínica, o que é indispensável para o sucesso das mais variadas terapias atualmente empregadas na Odontologia Estética.

2 PROPOSIÇÃO

Este projeto teve como objetivo geral, avaliar e comparar o efeito citotóxico transdentinário, grau de conversão e resistência de união à dentina de cimentos resinosos, fotoativados diretamente ou através da interposição de faceta cerâmica feldspática com 1 mm de espessura.

2.1 Objetivos Específicos

FASE 1- Avaliar e comparar a toxicidade transdentinária, sobre células odontoblastóides MDPC-23, de cimentos resinosos fotoativados diretamente ou através de facetas cerâmicas e seus respectivos sistemas adesivos;

FASE 2- Determinar o grau de conversão monomérica de cimentos resinosos fotoativados diretamente ou através de facetas cerâmicas;

FASE 3- Analisar e comparar a resistência de união à dentina de cimentos resinosos fotoativados diretamente ou através de facetas cerâmicas, associados aos respectivos sistemas adesivos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Citototoxicidade de Monômeros Resinosos

A composição básica dos cimentos resinosos consiste de uma fase orgânica, uma inorgânica e de agentes iniciadores. Os monômeros resinosos representam a fase orgânica, sendo que, dentre os diversos monômeros que podem ser utilizados na composição desses materiais, os principais são o BIS-GMA, UDMA, TEGDMA e HEMA. A característica hidrófila do material resinoso aumenta de acordo com a sequência dos monômeros apresentados, enquanto a relação inversa se aplica ao peso molecular deles. Partículas de carga, como silício, zircônia, bário, alumínio, fluoreto e cálcio compõem a fase inorgânica dos cimentos resinosos³³, sendo que os agentes iniciadores são incorporados para promover a polimerização destes materiais³⁴.

Diversos estudos avaliaram os efeitos citotóxicos de monômeros derivados de compósitos resinosos sobre variadas culturas celulares. Com o objetivo de analisar uma nova metodologia para testes de citotoxicidade indireta de materiais dentários e seus componentes, Hanks et al.³⁵ (1988) introduziram o dispositivo denominado de “câmara pulpar *in vitro*” (CPIV). Neste dispositivo, o qual buscava simular, em laboratório, condições clínicas *in vivo*, uma barreira de dentina obtida de dente humano era individualmente adaptada e mantida entre os espaços oclusal e pulpar da CPIV. A superfície oclusal da barreira permanecia exposta para receber o material dentário em teste, enquanto a superfície pulpar da barreira era mantida em contato com meio de cultura. Naquele primeiro estudo, os autores inicialmente compararam os efeitos de extratos obtidos diretamente de corpos de prova preparados com 4 resinas compostas experimentais, quando aplicados sobre uma monocamada de fibroblastos. Então, num segundo momento, usando as CPIVs, os autores coletavam os extratos (meio de cultura + componentes das quatro resinas compostas experimentais que se difundiram pela barreira dentinária), os quais também eram aplicados sobre fibroblastos. Para realizar este teste indireto, foram utilizadas barreiras de dentina com 0,5 ou 1,5 mm de espessura. Os pesquisadores observaram que as barreiras de dentina, também chamadas de discos de dentina, atuaram como membranas semipermeáveis capazes de restringir drasticamente a difusão de componentes dos materiais resinosos via túbulos dentinários. Duas resinas

compostas fotopolimerizáveis testadas (Fulfill e P30) causaram depressão na síntese de proteínas apenas nas primeiras 24 horas pós-polimerização e quando aplicadas sobre discos de dentina com 0,5 mm de espessura. As duas resinas compostas quimicamente ativadas (SILAR e PIO) não causaram inibição significativa da síntese de proteínas em qualquer tempo de pós-polimerização, independente da espessura dos discos de dentina. A partir deste estudo pioneiro, foi estabelecida uma metodologia inovadora para avaliar a citotoxicidade transdentinária de materiais dentários, com potencial para mimetizar, *in vitro*, condições clínicas de uso comum destes produtos.

Caughman et al.³⁶, avaliaram o efeito tóxico de resinas compostas sobre culturas primárias de fibroblastos gengivais humanos, sendo que para isto os autores analisaram o potencial dos materiais de inibir a síntese de proteína celular, medida pela incorporação de [³⁶S] metionina. Após preparar corpos de prova com as resinas contendo BIS-GMA, os autores polimerizaram os materiais por 15, 30 e 80 s e em seguida os expuseram ao calor (110°C) pelo período de 10 min. Então, os corpos de prova foram colocados em placas de cultura, onde permaneceram diretamente em contato com as células por 24 horas a 37°C. A monocamada de células marcada com [³⁶S] metionina, foi lavada e solubilizada, sendo a radioatividade incorporada quantificada por espectrometria de cintilação líquida. O grau de conversão de monômeros também foi calculado para cada grupo, tendo sido usado para isso espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier. Os pesquisadores demonstraram que a citotoxicidade dos materiais resinosos diminuiu com o aumento do tempo de fotopolimerização, o qual estava diretamente relacionado com índice de conversão monomérica. Ao comparar resinas compostas que apresentavam semelhante conversão de monômeros, foi determinado que outros fatores, tal como a relação partícula de carga/resina, poderiam ser responsáveis pelos efeitos citotóxicos causados pelos materiais. Os pesquisadores concluíram que tanto a composição química da resina composta, quanto o baixo grau de conversão dos monômeros apresentam papel importante nos efeitos tóxicos dos materiais.

De Souza Costa et al.²⁷ usaram dois protocolos para avaliar os efeitos citotóxicos de sistemas adesivos fotoativados ou não, quando aplicados sobre células odontoblastóides MDPC-23. Primeiramente, alíquotas padronizadas dos sistemas adesivos em teste (Single Bond, Prime & Bond 2.1 e Syntac Sprint) foram adicionados

em meio de cultura, sendo a solução final aplicada sobre células pulpares cultivadas em placas de 24 compartimentos. Então, as células que permaneceram aderidas nas placas foram contadas, sendo a morfologia delas analisada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). No segundo protocolo, os sistemas adesivos foram aplicados em discos padronizados de papel filtro, fotopolimerizados com luz halógena. Em seguida as amostras foram posicionadas no fundo de placas de 24 compartimentos, onde células MDPC-23 foram semeadas e incubadas por um período 72 horas. O halo de inibição em torno das amostras foi medido em microscopia de luz invertida, a morfologia celular foi avaliada em MEV e o ensaio de MTT foi realizado para avaliar respiração mitocondrial das células. Foi observado que a polimerização dos agentes adesivos resultou em redução de citotoxicidade. Porém, os autores concluíram que todos os sistemas adesivos avaliados foram tóxicos para as células MDPC-23, sendo que a intensidade destes efeitos adversos estava associada à presença de monômeros não reagidos e acidez de cada material.

Em estudo *in vivo* realizado por de Souza Costa et al.³⁷, foi avaliado a resposta da polpa dental humana após aplicação de um sistema adesivo de frasco único em cavidades profundas Classe V, submetidas ou não ao prévio condicionamento ácido. No primeiro grupo, foi realizado o condicionamento ácido total, seguido da aplicação de duas camadas do adesivo Single Bond (SB) e restauração das cavidades com resina composta (Z-100). Protocolo semelhante foi realizado no segundo grupo experimental, entretanto o condicionamento ácido foi feito apenas em esmalte. No terceiro grupo (controle), o assoalho cavitário foi forrado com cimento de hidróxido de cálcio antes de proceder a restauração adesiva. Dois dentes foram usados como grupo controle intacto. Após 30 dias, os dentes foram extraídos, processados em laboratório e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H/E), tricrômico de Masson e pela técnica de Brown e Brenn. Formação de longos tags de resina nos túbulos dentinários, associado a moderada desorganização e inflamação pulpar, ocorreram apenas nos dentes do grupo 1, cuja espessura do remanescente de dentina (RDT) era menor que 300 μm . No grupo 2, discreta inflamação pulpar foi determinada em apenas 1 dente, o qual apresentava RDT de 162 μm . Os dentes do grupo 3 (controle), apresentaram características histológicas de normalidade, semelhante àsquelas observadas na polpa dos dentes do grupo controle íntegro. Dessa maneira, foi possível determinar que o condicionamento ácido

da dentina faz com que o procedimento restaurador adesivo cause efeitos tóxicos significativos para a polpa. Portanto, considerando os resultados obtidos, os autores recomendaram a aplicação de um forrador cavitário biocompatível previamente ao condicionamento ácido das paredes cavitárias e posterior restauração adesiva.

Investigar a influência da espessura de discos de dentina sobre a resposta indireta de células pulpares a diferentes materiais dentários foi o objetivo do estudo de Galler et al.³⁸. Para tanto, dois sistemas adesivos (Syntac Classic e Prompt L-Pop) e um ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) foram aplicados sobre discos de dentina com espessuras que variavam entre 100 e 500 µm. Além de manter uma cultura tridimensional de células derivadas da polpa (SV40 Large T-antigen) em contato com os discos, os autores também aplicaram ou não pressão intra-pulpar simulada. Como controle negativo, foi utilizado um material de moldagem atóxico - Polivinilsiloxano (President, Coltène). Após 24 horas de exposição, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT. O sistema adesivo Syntac Classic diminuiu significativamente a atividade celular ($p \leq 0,0003$), independentemente da espessura dos discos de dentina usados. Por outro lado, este parâmetro influenciou significativamente os efeitos citotóxicos do Prompt L-Pop e Vitrebond. Com base no exposto, os autores concluíram que a dentina atua como barreira física semi-permeável, cuja espessura pode influenciar os efeitos tóxicos indiretos de diferentes materiais dentários.

No ano seguinte, de Souza Costa et al.¹⁴ avaliaram a resposta de polpas humanas após cimentação de restaurações inlay em cavidades de classe V confeccionadas na face vestibular de pré-molares. Para proceder a cimentação, os autores usaram os cimentos RelyX Unicem (cimento resinoso dual autocondicionante – 3M ESPE) e Variolink II (cimento resinoso dual – Ivoclar Vivadent). No grupo controle, após revestimento do assoalho da cavidade com hidróxido de cálcio (Dycal - Dentsply), as restaurações inlay foram cimentados com RelyX Unicem. Quatro dentes íntegros foram extraídos e assim usados no grupo controle intacto. Apenas para o cimento Variolink II, a cavidade foi previamente condicionada com ácido fosfórico 37%, seguido da aplicação do sistema adesivo Excite DSC, tal como recomendado pelo fabricante. Após 7 ou 60 dias, os dentes foram extraídos e processados para avaliação histológica. Após 7 dias, RelyX Unicem e Variolink II desencadearam uma resposta inflamatória leve e moderada, respectivamente. Aos 60

dias, a resposta pulpar diminuiu em ambos os grupos. Entretanto inflamação pulpar discreta, porém persistente, ocorreu quando o cimento Variolink II foi usado. Os autores sugeriram que esta inflamação tecidual crônica estava relacionada ao condicionamento ácido e aplicação do sistema adesivo sobre o substrato dentinário antes do uso do cimento resinoso Variolink II.

Baseados na hipótese de que o tempo de polimerização pode interferir nos efeitos tóxicos de materiais dentários, Ergun et al.³⁹ prepararam amostras dos seguintes cimentos resinosos de presa dual: RelyX Unicem, Duolink, Lute-It, Illusion e RelyX ARC. Para isso, os materiais foram manipulados como recomendado pelos fabricantes e imediatamente inseridos em matrizes circulares com dimensões padronizadas (6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura). Então, um disco de cerâmica (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foi interposto entre o cimento e a fonte de luz. A fotopolimerização foi realizada utilizando um aparelho de LED de alta potência, sendo que 20 amostras foram fotopolimerizadas por 20 segundos (redução de 50% no tempo de polimerização recomendado pelo fabricante) e as outras 20 amostras foram fotopolimerizadas por 40 segundos (como recomendado pelo fabricante). Então, as amostras foram retiradas das matrizes e imersas em meio de cultura por 24 horas para obtenção dos extratos de cada grupo, os quais foram aplicados sobre fibroblastos L-929. O teste de MTT foi usado pelos autores, o que permitiu a eles determinar que os materiais polimerizados por 20 s (exceto RelyX Unicem e Illusion) foram mais citotóxicos em comparação com amostras dos mesmos materiais polimerizados por 40 s. Assim, foi possível concluir que a redução do tempo de fotoativação aumenta significativamente a citotoxicidade dos materiais avaliados neste estudo, o que pode comprometer o desempenho clínico deles.

Com o propósito de avaliar a possível difusão transdentinária de monômeros liberados do cimento resinosos convencional Multilink Automix (Ivoclar Vivadent), Kerezoudi et al.⁴⁰ preparam discos de dentina humana, os quais foram acoplados a um dispositivo com pressão intra pulpar simulada (25 N). Então, placas transparentes de vidro foram cimentadas sobre a dentina e após 5 e 20 minutos, 1, 2 e 21 horas, bem como 3, 7, 10 e 21 dias, a solução presente nos dispositivos (extratos) foi coletada e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os resultados deste estudo mostraram que HEMA estava presente em todos os extratos até o último período de 21 dias. Os demais monômeros avaliados neste estudo (BPA,

UDMA e BisGMA) não foram detectados nos extratos. Segundo os autores, a presença comum de HEMA nos extratos ocorreu devido a característica hidrófila deste monômero, bem como seu menor peso molecular em comparação aos demais avaliados neste estudo laboratorial.

No mesmo ano, Garcia et al.²⁶ investigaram a citotoxicidade transdentinária de diferentes cimentos à base de resina em contato com células odontoblastóides (MDPC-23) e células da polpa dental humana (HDPCs). Para tal, discos de dentina foram acoplados em câmaras pulpares artificiais (CPAs), de tal forma que a superfície oclusal permaneceu exposta para a aplicação dos materiais e a superfície pulpar mantida em contato com meio de cultura. Então, os seguintes cimentos resinosos foram testados: RelyX Luting 2, RelyX U200 e RelyX ARC. O extrato (meio de cultura + componentes resinosos que se difundiram através da dentina) obtido de cada cimento foi aplicado por 24 horas sobre células HDPC ou MDPC-23, as quais foram submetidas ao teste de MTT. Maior redução de viabilidade celular ocorreu quando o extrato do cimento RelyX ARC foi aplicado sobre ambas as linhagens de células. Porém, de acordo com as normas da ISO 10993-5:1999 (E), redução da viabilidade maior do que 30 % caracteriza efeito tóxico, portanto todos os agentes cimentantes à base de resina avaliados neste estudo podem ser considerados não tóxicos para as células pulpares. Dessa forma, os autores concluíram que o tipo de material e os diferentes protocolos para sua aplicação são fatores que podem influenciar na citotoxicidade dos cimentos aplicados sobre a dentina com espessura de 0,4 mm.

O estudo laboratorial realizado por Mahdhaoui et al.⁴¹ teve como objetivo avaliar o papel das proteínas do fluído dentinário na difusão transdentinária de monômeros resinosos. Nesta pesquisa, um adesivo etch-and-rinse foi formulado com monômeros HEMA e BisGMA, sendo que canforoquinona e amina terciária foram usados como agentes iniciadores da reação de polimerização. Foram utilizados dois meios de diluição dos monômeros: solução salina tamponada (controle) e solução salina tamponada com albumina sérica bovina a 1% (BSA). Discos de dentina humana foram adaptados em câmaras pulpares artificiais, sendo a superfície oclusal condicionada com ácido. Então, os materiais adesivos foram aplicados sobre o substrato dentinário e fotopolimerizados. A difusão dos monômeros foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLEA). Os autores concluíram as que proteínas do plasma sanguíneo presentes no fluído dentinário, tal como a albumina,

podem aumentar a difusão de monômeros livres não reagidos liberados pelos agentes adesivos. Essas proteínas de baixo peso molecular são capazes de se ligar à monômeros hidrófobos (como BisGMA) e hidrófilos (como o HEMA), e transportá-los através dos túbulos dentinários.

Oguz et al.⁴² realizaram um estudo que avaliou a citotoxicidade de cimentos a base de resina em cultura de fibroblastos (NIH/3T3). Para isso, dois cimentos resinosos duais convencionais (RelyX ARC, Variolink N) e dois auto-adesivos (RelyX Unicem, Multilink Speed) foram manipulados de acordo com as recomendações dos fabricantes e inseridos em matrizes de politetrafluoretileno (espessura: 2 mm; diâmetro: 5 mm). A polimerização dos materiais foi realizada por: aplicação direta de LED (Bluephase 20i, Ivoclar Vivadent); aplicação de LED com interposição de disco de cerâmica de dissilicato de lítio (2 mm de espessura); aplicação de LED com interposição de discos de resina nano-cerâmica (2 mm de espessura); e auto-polimerização. As amostras polimerizadas dos cimentos resinosos foram imersas em meio de cultura pelo período de 0, 1, 2 e 7 dias. Para avaliar a citotoxicidade de cada material (MTT assay), os extratos de cada um deles foi coletado e aplicado sobre as células NIH/3T3 semeadas em placas de acrílico. Foi demonstrado que a citotoxicidade dos cimentos resinosos, a qual foi dependente de sua composição química, diminuiu gradualmente até o período de 7 dias. Os maiores valores de toxicidade foram registrados no dia 2 para cimentos resinosos convencionais e no dia 0 para cimentos auto-adesivos. A forma de auto-polimerização dos materiais resultou nos maiores valores de citotoxicidade, especialmente para o cimento Multilink Speed. Os autores concluíram que a fotopolimerização desempenha papel importante na redução dos efeitos citotóxicos.

3.2 Cimentos Resinosos

No início dos anos 1950, agentes cimentantes à base de monômeros de metilmetacrilato foram introduzidos no mercado. A maior vantagem alcançada com esta formulação foi a baixa solubilidade em meio aquoso, quando comparados aos cimentos disponíveis até então, como o fosfato de zinco e ionômero de vidro⁴³. Entretanto, a baixa adesão às estruturas dentais, elevada contração de polimerização

e coeficiente de expansão térmica, bem como as dificuldades para remoção dos excessos, causavam incertezas quanto a utilização segura deste novo material⁴⁴.

Com o avanço da Odontologia Adesiva e aprimoramento da formulação dos cimentos resinosos, estes materiais ganharam grande destaque, principalmente por serem capazes de se aderir à diferentes substratos, incluindo dentina, esmalte, cerâmicas e ligas metálicas⁴⁵. Assim, os cimentos de resina passaram a fornecer ligação forte e durável entre a cerâmica e os dentes, garantindo a longevidade do tratamento⁴⁶. Outras boas propriedades desses materiais são a alta resistência à tração e compressão, bom selamento marginal⁴⁷ e qualidades estéticas muito favoráveis⁵.

De acordo com a técnica e padrão de polimerização, os cimentos resinosos podem ser classificados como quimicamente ativados, fotoativados ou duais (ativados por reação química e luz)¹¹. Os cimentos puramente fotoativados possuem estabilidade de cor superior aos demais, devido à ausência de amina terciária em sua composição. Tal componente, responsável por promover a ativação da reação de polimerização de cimentos químicos e duais, pode oxidar-se ao longo do tempo e alterar a cor da restauração^{5,48}.

Laminados cerâmicos ultrafinos, conhecidos como “lentes de contato dentais”, consistem em restaurações indiretas com espessura que varia entre 0,2 a 0,5 mm⁴⁹. As facetas convencionais também são um tipo de laminado cerâmico, porém são mais espessas, entre 0,6 a 1,2 mm⁵⁰. Ambas são indicadas para corrigir problemas inerentes a forma, posição, simetria, textura superficial e cor dos dentes¹⁷. Devido a fina espessura destas peças protéticas, o agente cimentante a ser usado com estes materiais cerâmicos deve promover retenção e resistência satisfatória, bem como manter o padrão estético, o que é indispensável quando se realiza restaurações em dentes anteriores.

O desenvolvimento de aparelhos fotopolimerizadores mais modernos garantiu melhora na qualidade dos procedimentos restauradores⁵¹. No entanto, problemas ligados a redução na transmitância de luz, em função da espessura, tonalidade e opacidade do material cerâmico, podem levar a polimerização inadequada dos cimentos resinosos^{23,52,53}. Assim, com o intuito de compreender a

reação de polimerização pós-luz ou pós-mistura de cimentos resinosos, Yan et al.⁵⁴ analisou mudanças sucessivas no grau de conversão (GC) e micro dureza durante a polimerização dos materiais. Para tanto, amostras de cimentos fotoativados (Choice 2; RelyX Veneer), quimicamente ativados (Multilink; C&B Cement) e duais (Calibra; RelyX ARC) foram preparadas para análise em espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e teste de microdureza para determinar o GC e Dureza Vickers (DV), respectivamente. Os cimentos fotoativados ou pastas misturadas dos cimentos duais foram irradiados por 40 segundos com uma unidade fotopolimerizável (Elipar TriLight) através de um overlay de resina com espessura de 1,5 mm. Os espectros FTIR e leituras de DV foram obtidos nos períodos de 1, 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, 24 horas, 2 dias e 7 dias após o procedimento. Os resultados deste estudo apontaram que os materiais fotoativados apresentaram valores de GC significativamente maiores do que os materiais quimicamente ativados. A maior parte da reação de polimerização do Choice 2 e RelyX Veneer ocorreu dentro de 10 e 30 minutos, nesta ordem. O cimento dual RelyX ARC apresentou a reação de polimerização mais rápida (5 minutos) e o maior GC dentre os materiais avaliados neste estudo. Os valores de microdureza aumentaram até 24 horas para todos os cimentos, sendo que após esse período não ocorreram alterações adicionais na DV. A partir deste trabalho, concluiu-se que a reação de polimerização foi finalizada 24 horas após a mistura ou ativação pós-luz para todos os cimentos resinosos testados.

Diferentes tempos de exposição a luz de cimentos resinosos foram avaliados por Archegas et al.⁵². Neste estudo, amostras com 0,5 mm de espessura de um cimento resinoso dual (RelyX ARC), um cimento resinoso fotopolimerizável (RelyX Veneer) e uma resina flow (Filtek Z350) foram fotopolimerizadas por 40, 80 e 120 segundos através de discos de cerâmica feldspática translúcida ou opaca com espessura de 1 mm. Os espécimes foram armazenados a 37°C por 24 horas e então submetidos as análises de grau de conversão (GC), dureza (D) e módulo de elasticidade (E). Os autores observaram diferenças significativas para os três fatores avaliados (cimento, opacidade e tempo de exposição), bem como a interação entre eles. Quando os cimentos foram fotoativados por 40 segundos através da cerâmica opaca, menores valores de GC, D e E foram determinados. Entretanto, quando o tempo de exposição dos cimentos à luz foi de 120 segundos, GC semelhante foi observado para todos os grupos. Ainda, maiores valores de D e E foram encontrados

quando os materiais foram expostos a luz por 120 segundos. Este estudo sugere que para garantir uma maior eficiência de polimerização, os cimentos resinosos fotoativados e duais devem ser expostos a luz por mais tempo.

Durante a cimentação de peças protéticas, a polimerização dos cimentos resinosos fotoativados pode ser prejudicada pela atenuação da transmissão da luz emitida pelo aparelho fotopolimerizador. Em um estudo realizado por Runnacles et al.⁵⁵, os autores avaliaram o efeito da interposição de facetas de cerâmica sobre o grau de conversão (GC) de um cimento resinoso fotoativados (RelyX Veneer). Para isso, quatro tipos de facetas de cerâmica (IPS InLine, IPS Empress Estética, IPS e.max LT-baixa translucidez e IPS e.max HT-alta translucidez) foram confeccionadas com espessuras de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mm. Então, as facetas foram interpostas sobre o cimento, o qual foi fotopolimerizado por 40 segundos com um aparelho LED (irradiância: 1.000 mW/cm²). Como controle negativo, o cimento foi fotopolimerizado sem a interposição das facetas cerâmicas. O GC foi avaliado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Os resultados deste estudo demonstraram GC semelhante ao grupo controle quando facetas com 0,5 e 1,0 mm de espessura foram interpostas. Dentre as facetas de 1,5 mm, o IPS e.max LT foi o único material que diferiu significativamente do grupo controle. Com a espessura de 2,0 mm, apenas as facetas cerâmicas IPS e.max LT e HT obtiveram GC semelhantes ao grupo controle. Os autores concluíram que o GC do cimento resinoso fotopolimerizável RelyX Veneer depende da espessura e tipo de cerâmica usada, especialmente quando as facetas apresentam espessura superior a 1,5 mm.

Morgan et al.⁵⁶ avaliaram a correlação entre a citotoxicidade e o grau de conversão (GC) de cimentos resinosos autocondicionantes duais. Neste estudo, seis grupos experimentais foram estabelecidos a partir de três cimentos (RelyX Unicem; Set-SDI; e BifixSE). Os materiais foram manipulados e em seguida fotoativados ou não por 20 segundos. Para o ensaio de citotoxicidade, fibroblastos L929 cultivados em placas de 96 poços foram expostos aos extrato dos cimentos por 24 horas. Meio de cultura Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (DMEM) puro foi usado como controle. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT e o GC foi avaliado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Os resultados deste estudo mostraram que a citotoxicidade dos cimentos resinosos autocondicionantes está diretamente relacionada ao GC dos materiais. Quando os materiais foram

fotoativados, maiores valores de viabilidade celular foram encontrados. Com exceção ao Rely-X Unicem, todos os demais cimentos, fotopolimerizados ou não, apresentam algum nível de citotoxicidade. Esses resultados indicam que uma adequada fotopolimerização deve ser empregada para prevenir que possíveis efeitos citotóxicos ocorram ao usar cimentos de resinosos autocondicionantes de polimerização dual.

Com o objetivo geral de avaliar as limitações do uso de cimentos resinosos fotoativados (CRF), Hardy et al.⁵⁷ mensuraram a transmissão de luz através de restaurações indiretas e o grau de conversão (GC) resultante dos cimentos aplicados sob as restaurações. Inicialmente, discos com 10 mm de diâmetro e com espessuras de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mm, foram obtidos a partir de blocos CAD/CAM (LAVA Zirconia e LAVA Ultimate). Neste estudo, o cimento comercial RelyX Veneer foi utilizado como grupo controle e quatro CRF experimentais foram formulados com a seguinte composição: monômeros TEGDMA e BisGMA (50/50 ou 30/70% em peso, respectivamente); fotoiniciadores canforoquinona/amina (0,2/0,8% em peso) ou Lucirin-TPO (0,42% em peso); e micropartículas (55% em peso) e nanopartículas (10% em peso). Os cimentos foram fotopolimerizados através dos discos por 40 segundos. Para o ensaio do GC, as amostras foram analisadas por espectroscopia Raman, enquanto a transmitância, fração da luz que atravessa uma amostra de matéria, foi medida usando espectroscopia UV-Vis. Os autores observaram que os cimentos com alto teor de TEGDMA apresentaram maior GC. Apenas quando discos com espessura ≥ 2 mm foram interpostos entre os cimentos e a fonte luz, redução significativa do GC ocorreu. A transmitância de luz reduziu significativamente de acordo com o aumento da espessura dos discos. Foi concluído que vários fatores, tais como o tipo de monômero, conteúdo de fotoiniciador e tempo de fotoativação do cimento, bem como a composição química e espessura do material restaurador, podem limitar a qualidade final de cimentos resinosos fotoativados.

No mesmo ano, Rizzante et al.⁵⁸ compararam a microdureza, estabilidade de cor (ΔE) e grau de conversão (GC) do cimento resinoso Variolink Veneer, fotopolimerizado através de restaurações de cerâmica com diferentes espessuras. Para isso, discos de dissilicato de lítio foram obtidos a partir de blocos CAD IPS E-max e IPS in-Ceram e divididos em 7 grupos: CTR – ausência da cerâmica (grupo controle); 06 M (0,6 mm monolítico); 12 M (1,2 mm monolítico); 20 M (2,0 mm monolítico); 06B (0,4 + 0,2 mm bicamada); 12B (1,0 + 0,2 mm bicamada); 20B (1,8 +

0,2 mm bicamada). O cimento resinoso foi fotopolimerizado através da cerâmica e as amostras foram avaliadas para ΔE usando um espectrofotômetro após 24 horas e 7 dias. Os testes de microdureza e GC foram realizados imediatamente após a fotopolimerização e depois de 24 horas e 7 dias. Em todos os grupos, o GC aumentou de acordo com os períodos de análise, sendo que correlação inversa foi observada quando do aumento da espessura e camadas da cerâmica. Entretanto, apenas o grupo 20B apresentou diferenças significantivas em comparação ao CTR. Todos os grupos experimentais apresentaram valores de microdureza semelhantes, embora inferiores aos do grupo CTR. A ΔE foi semelhante entre todos os grupos após 24 horas (exceto para 12B e 20B), e aumentou para todos os grupos após 7 dias, especialmente para os grupos com bicamada. O Grupo 06M foi o único grupo que apresentou ΔE semelhante ao CTR. Os autores concluíram que a interposição da cerâmica pode diminuir a microdureza dos cimentos resinosos e a estabilidade da cor, especialmente para cerâmicas mais espessas e de bicamada, embora nem sempre esteja correlacionado com o GC.

O propósito do estudo de Drumond et al.⁵⁹ foi comparar o efeito de duas técnicas de processamento (prensagem e CAD/CAM) de cerâmicas de dissilicato de lítio, através da análise do grau de conversão (GC) e resistência de união (RU) ao microcissalhamento de cimentos resinosos. Para tanto, discos de cerâmica com 10 mm de diâmetro e 0,6 mm espessura foram fabricados por meio das técnicas Press (IPS e.max Press) e CAD/CAM (IPS e.max CAD). Então, amostras do cimento resinoso fotopolimerizável Variolink Veneer LC foram fotoativadas através dos discos de cerâmica e submetidos a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier para análise do GC. A fim de avaliar a RU, amostras de dissilicato de lítio com 6,5 mm de comprimento, 5 mm de largura e 1 mm de espessura, foram preparadas por ambas técnicas de processamento. As amostras foram jateadas com partículas de Al_2O_3 (50 μm), condicionadas com ácido fluorídrico a 10% por 20 segundos e submetidas a aplicação do Primer RelyX Ceramic. Em seguida, o agente adesivo multi-uso Adper Scotchbond (3M) foi aplicado nas amostras e fotoativado por 10 segundos. Dois cilindros de plástico de 1 mm de comprimento foram adaptados em cada amostra e preenchidos com o cimento resinoso. Cada cilindro foi fotoativado por 20 segundos. Em seguida, os tubos de plástico foram removidos e a RU ao microcissalhamento foi determinada. Tanto o GC do Variolink Veneer LC fotoativado

através da cerâmica, quanto a RU deste cimento à cerâmica foram estatisticamente maiores no grupo onde foi usada a técnica CAD/CAM (44,74% e 22,18 MPa) em comparação a técnica prensagem (25,71% e 19,83 MPa). Portanto, os autores concluíram que a técnica de processamento da cerâmica pode interferir na conversão do cimento resinoso fotoativado, bem como na resistência de união ao microcisalhamento do material.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Fase 1: Citotoxicidade Transdentinária de Cimentos Resinosos Fotoativados

4.1.1 Preparo das facetas cerâmicas

Um total de setenta e duas amostras (facetas) foram preparadas com cerâmica feldspática Super Porcelain EX- 3 Speed, Enamel S3 (Noritake Dental Supply Co Ltda; Nagoya, Aichi, Japão). Com a finalidade de padronizar as dimensões iniciais dessas amostras em 7,5 mm de diâmetro e 1,4 mm de espessura, matrizes bipartidas de aço inoxidável foram utilizadas. Para cada 200 mg de pó de cerâmica, foram adicionados 120 µL de água destilada com uma pipeta (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), sendo a mistura imediatamente inserida na matriz metálica. A mistura foi condensada e o excesso de água destilada foi removido com papel absorvente (J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil). A superfície das amostras obtidas foi nivelada com uma espátula nº 24 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil), de tal forma que elas apresentassem espessura uniforme antes de sua remoção do molde. Após abertura das matrizes, as amostras cerâmicas obtidas foram submetidas a um ciclo de sinterização em forno apropriado (Alumini Press II, EDG; São Carlos, SP, Brasil) de acordo com o protocolo de queima recomendado pelo fabricante (Quadro 1).

Quadro 1 - Parâmetros usados neste estudo para queima da porcelana, a qual empregou temperaturas e tempos de sinterização recomendados pelo fabricante

Tempo de secagem (min)	Temperatura inicial (°C)	Início vácuo (°C)	Taxa de elevação (°C/min)	Saída vácuo (°C)	Temperatura máxima (°C)	Tempo de manutenção (min)	Resfriamento (min)
8	600	600	45	920	930	0	0

Fonte: Elaboração própria

Concluída a sinterização, as superfícies das amostras foram cuidadosamente regularizadas manualmente com lixas d'água de granulação 400 e 600 (3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA), constantemente umedificadas com água

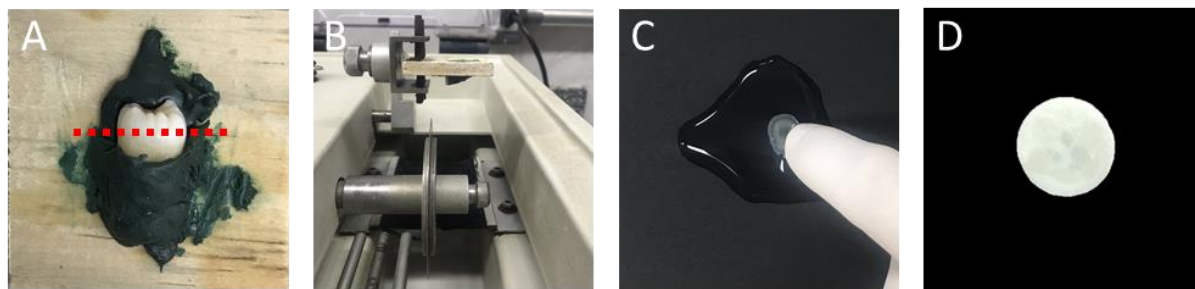
deionizada. Ao final, as amostras de cerâmica feldspática apresentaram 6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, sendo estas dimensões aferidas com paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., Suzano, SP, Brasil). As amostras foram submetidas a quatro ciclos de 408 segundos (cada) em 15 mL de acetona (0,790 g/mL; Neon Comercial Ltda., Suzano, SP, Brasil), posteriormente no mesmo volume de propanol a 99,5% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil), e por último em água destilada. Então, as amostras tiveram os resíduos superficiais removidos por ultrassom (Biowash – Bioart, São Carlos, SP, Brasil) e finalmente secas em incubadora a 40°C pelo período 24 horas⁶⁰.

O preparo destas amostras (facetas) padronizadas de cerâmica foi realizado nas três fases deste estudo. Previamente à realização da análise de citotoxicidade transdentinária, as facetas de cerâmica foram esterilizadas em autoclave (Phoenix Luferco, Araraquara, SP, Brasil).

4.1.2 Obtenção dos discos de dentina

Cem terceiros molares humanos hígidos foram obtidos do banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CAAE: 14896319.2.0000.5416) (ANEXO). Em seguida, com o uso de godiva (Lysanda Prod. Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), cada dente foi fixado em uma base de madeira, e com auxílio de uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltda.), sob refrigeração em água, foi obtido um disco de dentina coronária de cada dente. As superfícies dos discos de dentina foram lixadas e regularizadas manualmente com lixas d'água de granulação 400 e 600 (3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil), umedecidas com água deionizada, até alcançar a espessura final de 0,4 mm, a qual foi determinada por meio de paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América, Ltda. São Paulo, SP, Brasil). Com uma ponta diamantada cilíndrica (número 3098 – KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em alta rotação (KaVo Keer, Joinville, SC, Brasil) e sob abundante refrigeração, os discos de dentina foram reduzidos até atingir o diâmetro final de 8 mm (Figura 1).

Figura 1 - Etapas realizadas para obtenção dos discos de dentina



A- Dente fixado em base de madeira; B- Obtenção dos discos de dentina em cortadeira metalográfica; C- Redução em lixas d'água; D- Disco de dentina.

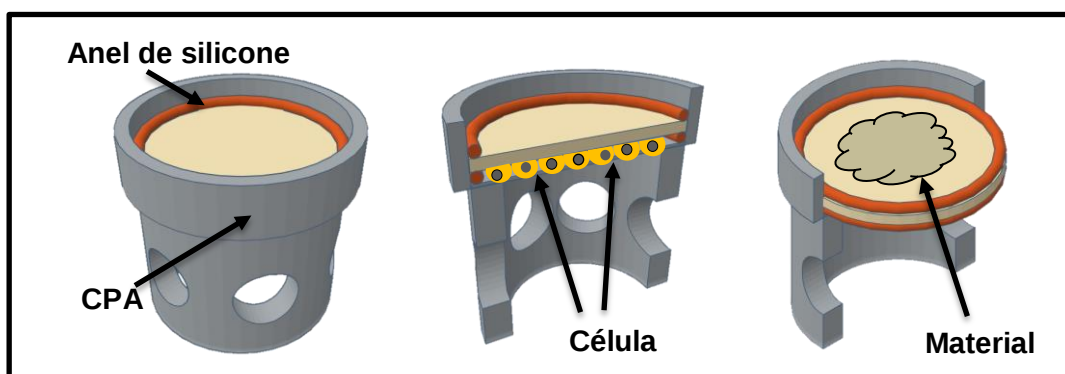
Fonte: Elaboração própria.

Com objetivo de obter dados de citotoxicidade transdentinária confiáveis e reproduzíveis, a condutância hidráulica de todos os discos de dentina selecionados para este estudo laboratorial foi previamente determinada. Este procedimento tem sido utilizado por outros pesquisadores para padronizar todos os grupos quanto a permeabilidade do substrato dentinário⁶¹. Para proceder o teste de condutância hidráulica, 50 μL de solução de EDTA 0,5 M (Sigma-Aldrich Corp.) foi aplicada, com auxílio de uma pipeta (Eppendorf AG), sobre a superfície oclusal e pulpar dos discos por 30 segundos para remoção da smear layer, seguido de lavagem com água deionizada pelo mesmo período⁶¹. Então, os discos foram individualmente adaptados numa câmara de perfusão e uma cânula foi conectada a uma coluna d'água de 1,80 m por meio de um tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro para avaliação da condutância hidráulica. Em seguida, foi permitido exsudar água por estes discos pelo período de 5 minutos, para que possíveis resíduos fossem eliminados dos túbulos dentinários. A condutância hidráulica foi determinada através do deslocamento de uma bolha de ar presente no sistema durante os períodos de 15 e 30 segundos, através da fórmula $L_p = J_v / A \cdot \Delta P \cdot t$, onde " L_p " é a condutância hidráulica ($\mu\text{L cm}^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ cm H}_2\text{O}^{-1}$), " J_v " é o volume de fluido em $\mu\text{L/mm}$, " A " é a área de superfície da dentina (cm^2), " ΔP " é a pressão hidrostática em $\text{cm H}_2\text{O}$ e " t " é o tempo necessário para o movimento do fluido (min). Concluída esta análise, os discos foram distribuídos em grupos, de modo que não apresentassem diferença estatisticamente significativa entre os valores numéricos médios obtidos (ANOVA, $p > 0.05$)⁶¹.

Para realizar o teste de citotoxicidade, a superfície oclusal de cada disco de dentina foi lixada durante 10 segundos com lixa d'água de granulação 320 (3M

ESPE) para a formação de uma camada homogênea de smear layer⁶². Em seguida, os discos foram individualmente posicionados, com a superfície oclusal voltada para cima, em câmaras pulpares artificiais (CPAs), onde permaneceram interpostos por dois anéis de silicone e vedados perifericamente com cera utilidade (Lysanda Prod. Odontológicos Ltda., Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo da câmara pulpar artificial (CPA)



Disco de dentina adaptado entre anéis de silicone. As células odontoblastóides MDPC-23 são cultivadas na superfície pulpar do disco, enquanto o material em teste é aplicado na superfície oclusal dele.

Fonte: Elaboração própria.

Os conjuntos disco-CPA foram individualmente embalados em papel grau cirúrgico (Hospflex, Sorocaba, SP, Brasil) e submetidos à esterilização em óxido de etileno (Acecil, Campinas, SP, Brasil)⁶¹.

4.1.3 Cultivo das células odontoblastóides MDPC-23

Células imortalizadas da linhagem odontoblástica MDPC-23, armazenadas no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp, foram descongeladas e cultivadas em garrafas de 100 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina (GIBCO), em incubadora com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C (Thermo Fisher Scientific,). As células foram

subcultivadas a cada 3 dias até a obtenção do número suficiente para a realização do experimento.

4.1.4 Procedimento experimental

No interior de uma capela de fluxo laminar vertical (Vecoflow Ltda., Campinas, SP, Brasil) submetida a cuidadosa assepsia com álcool 70%, os conjuntos disco/CPA esterilizados foram individualmente posicionados em compartimentos de placas de 24 compartimentos (KASVI Imp., Curitiba, PR, Brasil), de modo que a superfície pulpar dos discos de dentina estivesse voltada para cima. A seguir, células MDPC-23 em 20 µL de DMEM foram semeadas (3×10^4 células/disco) sobre a superfície pulpar dos discos de dentina. Após manter as placas com os conjuntos disco/CPA em incubadora por 30 minutos, tempo necessário para adesão inicial das células na dentina, 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB foi adicionado em cada compartimento. Os conjuntos disco/CPA foram mantidos em atmosfera com 5% de CO₂, na temperatura de 37°C por um período adicional de 48 horas⁶¹. Após este período, o meio de cultura foi removido e 2 mL de DMEM sem SFB foi aplicado sobre cada conjunto disco/CPA, os quais foram cuidadosamente girados dentro dos compartimentos. Desta maneira, a superfície oclusal dos discos passou a ficar voltada para cima e a superfície pulpar deles para baixo. Então, 1 mL do DMEM sem SFB de cada compartimento foi aspirado, de tal forma que a superfície oclusal dos discos foi exposta para receber os tratamentos propostos neste estudo, enquanto a superfície pulpar, onde as células estavam aderidas, permaneceu em contato com o DMEM⁶¹.

Previamente à aplicação dos cimentos, a superfície oclusal dos discos foi lavada com PBS (VETEC Química Fina Ltda.), o excesso de umidade removido com papel absorvente esterilizado (J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil), e então foi realizado o condicionamento do substrato por 15 segundos com ácido fosfórico a 37% (Condac 37, FGM, Joinville, SC, Brasil). Após lavagem da dentina com 2 mL de PBS para remoção do agente ácido, o excesso de umidade foi novamente removido com discos de papel absorvente esterilizados. Na sequência, com auxílio de um microbrush esterilizado (KG Sorensen), os sistemas adesivos foram aplicados sobre a dentina desmineralizada, de acordo com o Quadro 2. Após preparar os cimentos

resinosos, 20 µL do material foi aplicado com uma pipeta de alta viscosidade (Gilson Incorporated, Middleton, WI, EUA) sobre a dentina hibridizada. Para fotoativação dos cimentos resinosos avaliados neste estudo, foi utilizado um dispositivo com diodo emissor de luz (LED) de alta potência (modo standard; 800 mW/cm²; VALO, Ultradent, Salt Lake City, UT, EUA). A irradiância foi avaliada com auxílio de um radiômetro (Radii Plus, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália), imediatamente antes de seu uso e após a interposição da faceta cerâmica.

Nesta fase do estudo, os discos pertencentes ao grupo controle negativo (CN) não receberam qualquer tratamento. Como controles positivos (CP) para cada cimento resinoso foram utilizados os sistemas adesivos recomendados pelos seus respectivos fabricantes. Os cimentos resinosos foram fotoativados diretamente ou através de uma faceta de cerâmica feldspática com 1 mm de espessura. Para os grupos onde os cimentos foram recobertos com as facetas cerâmicas, um dispositivo metálico esterilizado, com peso de 0,5 Kg, foi aplicado sobre as amostras para padronizar a pressão de cimentação⁶³.

A composição química dos sistemas adesivos e cimentos resinosos usados neste estudo está demonstrada na Quadro 2.

Quadro 2 - Relação dos sistemas adesivos e cimentos resinosos fotoativados avaliados, seus respectivos fabricantes e composição química

GRUPOS	FABRICANTES	COMPOSIÇÃO
Single Bond Universal	3M ESPE	10-Metacriloiloxidecil di-hidrogenofosfato (MDP), metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA), resinas de dimetacrilato, copolímero Vitrebond, partículas de carga, etanol, água, iniciadores, silano.
Tetric N- Bond Universal	Ivoclar Vivadent	2-Hydroxyethyl metacrilato (HEMA), bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato (Bis-GMA), 1,10-decandiol dimethacrylate, 10-metacriloiloxidecil di-hidrogenofosfato (MDP), canforoquinona, 2-dimethylaminoethyl methacrylate, água, etanol, dióxido de silício altamente disperso e estabilizadores.
Ambar Universal APS	FGM	10-Metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato (MDP), monômeros metacrílicos, composição fotoiniciadora (APS), coiniciadores, estabilizante, nanopartículas de sílica, etanol e água.
RelyX Veneer	3M ESPE	Cerâmica tratada com silano, dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato (BIS-GMA), sílica tratada de silano, polímero de policaprolactona reagido, dióxido de titânio, hexafluorofosfato de difeniliodônio, trifenilantimonia e água.
Variolink Esthetic LC	Ivoclar Vivadent	Dimetacrilato de uretano (UDMA), monômeros de metacrilato, trifluoreto de itérbio, óxidos mistos esféricos, Ivocerin, estabilizadores e pigmentos.
Allcem Veneer APS	FGM	Monômeros metacrílicos, composição fotoiniciadora (APS), canforquinona, coiniciadores, estabilizantes, pigmentos, partículas de vidro de Bário-Alumino-Silicato silanizados e dióxido de silício.
RelyX Veneer + Faceta Cerâmica	3M ESPE	Cerâmica tratada com silano, dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato (BIS-GMA), sílica tratada de silano, polímero de policaprolactona reagido, dióxido de titânio, hexafluorofosfato de difeniliodônio, trifenilantimonia e água.
Variolink Esthetic LC + Faceta Cerâmica	Ivoclar Vivadent	Dimetacrilato de uretano (UDMA), monômeros de metacrilato, trifluoreto de itérbio, óxidos mistos esféricos, Ivocerin, estabilizadores e pigmentos.
Allcem Veneer APS + Faceta Cerâmica	FGM	Monômeros metacrílicos, composição fotoiniciadora (APS), canforquinona, coiniciadores, estabilizantes, pigmentos, partículas de vidro de Bário-Alumino-Silicato silanizados e dióxido de silício.

Fonte: Bula dos materiais e MSDS fornecida pelos fabricantes.

Os grupos estabelecidos neste estudo (n=6), bem como o resumo dos protocolos de aplicação dos materiais dentários estão apresentados no Quadro 3.

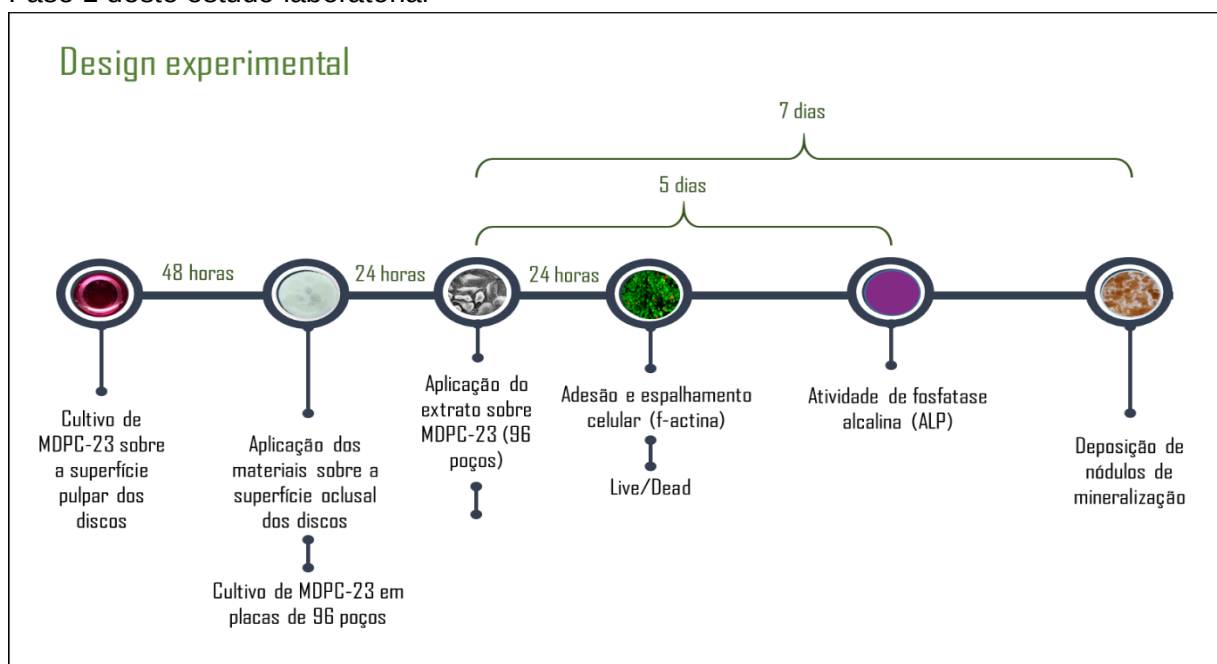
Quadro 3 - Grupos estabelecidos para realizar a análise de citotoxicidade transdentinária dos materiais resinosos aplicados de acordo com as recomendações do fabricante

GRUPOS	PROTOCOLOS
CN	Lavar a superfície oclusal dos discos com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com papel absorvente (PA), deixando a dentina levemente úmida.
CP 1 - Single Bond Universal (SB)	Condicionar a dentina com ácido fosfórico (AF) 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Single Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s e fotoativar o adesivo por 10 s.
CP 2 - Tetric N-Bond Universal (TN)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando a dentina levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Tetric N-Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s e fotoativar o adesivo por 10 s.
CP 3 - Ambar Universal APS (AU)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando a superfície levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Ambar Universal por 10 s. Reaplicar o adesivo Ambar Universal ASP. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s e fotoativar o adesivo por 10 s.
RelyX Veneer (RV)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando a superfície levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Single Bond Universal por 20 s. Não fotopolimerizar. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s, aplicar 20 µL do cimento resinoso sobre a dentina hibridizada e fotoativar por 30 s.
Variolink Esthetic LC (VE)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando a dentina levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Tetric N-Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s e fotoativar o adesivo por 10 s. Aplicar 20 µL do cimento resinoso sobre a dentina hibridizada e fotoativar por 20 s.
Allcem Veneer APS (AV)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando a superfície levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Ambar Universal APS por 10 s. Reaplicar o adesivo Ambar Universal ASP. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotopolimerizar. Aplicar 20 µL do cimento resinoso sobre a dentina hibridizada e fotoativar por 40 s.
RelyX Veneer + Faceta Cerâmica (RV+FC)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície oclusal com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Single Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotopolimerizar. Aplicar 20 µL do cimento resinoso sobre a dentina hibridizada. Colocar a faceta cerâmica sobre o cimento. Posicionar o dispositivo metálico sobre a faceta e fotoativar por 30 s. Remover o dispositivo e fotoativar por mais 30 s.
Variolink Esthetic LC + Faceta Cerâmica (VE + FC)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície oclusal com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Tetric N-Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s e fotoativar o adesivo por 10 s. Aplicar 20 µL do cimento resinoso a dentina hibridizada. Colocar a faceta cerâmica sobre o cimento. Posicionar o dispositivo metálico sobre a faceta e fotoativar por 20 s. Remover o dispositivo e fotoativar por mais 20 s.
Allcem Veneer APS + Faceta Cerâmica (AV + FC)	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície oclusal com 2 mL de PBS, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Ambar Universal APS por 10 s. Reaplicar o adesivo Ambar Universal ASP. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotopolimerizar. Aplicar 20 µL do cimento resinoso sobre a dentina hibridizada. Colocar a faceta cerâmica sobre o cimento. Posicionar o dispositivo metálico sobre a faceta e fotoativar por 40 s. Remover o dispositivo e fotoativar por mais 40 s.

Fonte: Elaboração própria.

Finalizada a aplicação dos materiais de acordo com as recomendações dos fabricantes, as placas de acrílico contendo os conjuntos disco/CPA foram colocadas em incubadora por 24 horas em atmosfera com 5% de CO₂, na temperatura de 37°C. Após este período, foi realizada a avaliação da viabilidade das células que permaneceram aderidas na superfície pulpar dos discos de dentina. O volume de 1 mL de DMEM sem SFB que estava em contato com a superfície pulpar dos discos de dentina, o qual possivelmente passou a conter componentes dos materiais que se difundiram pelo substrato dentinário, foi coletado de cada compartimento. Esta solução, denominada de extrato, foi aplicada sobre as células MDPC-23 previamente cultivadas (1x10⁴ células/compartimento) em placas de 96 compartimentos (Kasvi Imp.), sendo assim usadas para realizar os demais testes propostos neste estudo. Para avaliar a viabilidade/adesão/espalhamento das células, 100 µL do extrato foi incubado em contato com as células pelo período de 24 horas à 37°C e 5% CO₂. Para determinar a influência dos materiais sobre a atividade de fosfatase alcalina (ALP) e deposição de nódulos de mineralização (NM), as células pulpares expostas aos extratos por 24 horas, foram incubadas em meio osteogênico (DMEM com 10% SFB, suplementado com β-glicerofosfato e ácido ascórbico; Sigma-Aldrich Corp.) pelos períodos de 5 e 7 dias respectivamente (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma representativo da sequência de testes de citotoxicidade realizados na Fase 1 deste estudo laboratorial



Fonte: Elaboração própria.

4.1.5 Viabilidade das células cultivadas na dentina (Alamar Blue)

A viabilidade das células MDPC-23 que permaneceram aderidas à superfície pulpar dos discos de dentina (n=6) foi avaliada 24 horas após a aplicação dos cimentos resinosos. Para isso, os conjuntos disco/CPA foram transferidos para novas placas de 24 compartimentos (Kasvi Imp.), onde foram posicionados com a superfície pulpar da dentina voltada para cima. Uma solução composta por 90 µL de DMEM e 10 µL da solução Alamar Blue (Life Technologies; Grand Island, NY, EUA) foi aplicada sobre as células aderidas aos discos de dentina⁶¹. As placas com os conjuntos disco/CPA foram colocadas em incubadora por 3 horas a 37°C e 5% CO₂, possibilitando a penetração do corante através da membrana citoplasmática das células previamente expostas aos extratos. Após este período, a solução foi coletada e transferida para uma placa de 96 compartimentos (KASVI Imp.), sendo a fluorescência mensurada a 560 nm de excitação e 590 nm de emissão em espectrofotômetro (Synergy H1, Biotek, Winooski, EUA)⁶⁴. O valor médio de absorbância do grupo CN no período de 24 horas foi considerado como 100% de viabilidade celular, sendo este o parâmetro usado como base para determinar os valores de viabilidade (em porcentagem) para todos os demais grupos⁶⁴.

4.1.6 Viabilidade das células cultivadas nos compartimentos (Live/Dead)

Após 24 horas de exposição aos extratos, as células MDPC-23 vivas e mortas foram avaliadas por meio do teste de Live/Dead (Live/Dead cell viability/cytotoxicity kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para isso, as células foram incubadas (n=4) por 30 minutos em contato com 100 µL de DMEM suplementado com os marcadores Calcein AM e Ethidil Homodímero-1 (Invitrogen), na concentração de 1:1000⁶⁵. Em seguida, as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Leica DM 5500B, Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha) para obtenção de imagens representativas de cada grupo⁶⁵.

4.1.7 Adesão e espalhamento celular (F-actina)

Para realização desta análise, após 24 (n=4) de exposição aos extratos, as células que permaneceram aderidas ao substrato de acrílico foram fixadas com 100 µL de uma solução de formaldeído à 4% (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), submetidas à permeabilização em 0,1% Triton (Sigma-Aldrich Corp.), e então incubadas com a sonda fluorescente específica em BSA 2% por 20 minutos (Santa Cruz Biotechnology inc., Dallas, Texas, EUA) para detecção dos filamentos de actina⁶⁵. Para contra-marcação nuclear, foi utilizado o Hoescht (Invitrogen). As amostras foram lavadas em PBS (VETEC Química Fina LTDA.) e analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DM)⁶⁵.

4.1.8 Avaliação da morfologia celular (MEV)

Após o período de 24 horas da realização dos protocolos experimentais, as células MDPC-23 que permanecerem aderidas aos discos (n=4) foram fixadas por 1 hora em 1 mL de glutaraldeído 2,5% (VETEC Química Fina Ltda.). Então, as células foram pós-fixadas em 200 µL de tetróxido de ósmio a 1% (60 minutos; Sigma-Aldrich Corp.), desidratadas em 1 mL de soluções com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 95%, 100%) e lavadas por três vezes com 200 µL de 1,1,1,3,3,3,-hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma-Aldrich Corp.) durante 20 minutos. Os discos foram então aderidos com fita de carbono (Koch Electron Microscopy, Rave Scientific, Heller Park Lane Somerset, NJ, EUA) sobre stubs metálicos circulares, os quais foram mantidos em dessecador (Laborquimi Ltda., Poá, SP, Brasil) durante 72 horas, para serem, em seguida, metalizados com ouro por 40 segundos (Sistevac, Rolândia, PR, Brasil). Finalmente, as células presentes no substrato dentinário tiveram a morfologia avaliada em microscópio eletrônico de varredura (MEV - JEOL MODELO JSM7500F Scanning Microscope, Tóquio, Japão)⁶⁶.

4.1.9 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Decorrido 24 horas da exposição ao extrato, as células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao fundo dos compartimentos das placas de 96 poços (Kasvi

Imp.), receberam 100 μL de um meio de cultura osteogênico (DMEM com 10% SFB, suplementado com β -glicerofosfato e ácido ascórbico; Sigma-Aldrich Corp.). Após 5 dias de incubação em meio osteogênico, as células foram avaliadas pelo teste de timolftaleína monofosfato ($n=4$) por meio do protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Uma solução de 100 μL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich Corp.) foi usada por 40 minutos para promover lise celular. Em seguida, para proceder a quantificação da dosagem de ALP, uma alíquota da reação de lise foi transferida para uma placa de 48 compartimentos (Kasvi Imp.) contendo 10 μL de timolftaleína monofosfato (reagente nº 1 do Kit - 22 mmol/L^{-1}) e 100 μL solução tampão (300 mmol L^{-1} , pH 10.1 - reagente nº 2 do Kit)⁶⁴. Após 15 minutos de incubação à 37°C, 400 μL de um reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L^{-1} e hidróxido de sódio 250 mmol/L^{-1} - reagente nº 3 do Kit) foi adicionado e então 100 μL foram coletados para determinação da absorbância a 590 nm em espectrofotômetro (Synergy H1).

Para normalização da atividade da enzima ALP, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelas células, utilizando para isso o método de Lowry a partir de uma curva padrão (0; 32; 64; 96; 128; 160 $\mu\text{g/mL}$). No primeiro momento, uma alíquota de 25 μL da mesma amostra do lisado de células foi transferida para a placa de 96 compartimentos (Kasvi), sendo que em seguida 50 μL de solução de reagente de Lowry (Sigma Chemical Co.) foi adicionado à placa e mantida em temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado 25 μL de solução de Folin e Ciocalteau's Phenol Reagent (Sigma Chemical Co.) na concentração 1:4 diluído em água destilada. Após 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 655 nm (Synergy H1).

A dosagem de ALP (μmol de timolftaleína/ $\text{mim}=\text{U}$) foi calculada a partir de uma curva padrão pré-estabelecida com as concentrações de 0; 1,818; 3,636; 7,272; 14,545; 21,818; 29,09 U/L de ALP (Reagente nº 4; Fosfatase Alcalina; Labest). Os dados foram normalizados a partir da divisão do valor da dosagem de ALP pelo valor obtido da quantificação de proteínas totais, sendo expressos em $\text{U}/\mu\text{g}$ ⁶⁴. Então, os valores foram transformados em porcentagem, sendo o grupo controle negativo (CN) considerado como 100% de atividade de ALP⁶⁴.

4.1.10 Deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red)

A deposição de NM foi determinada pelo teste de Alizarin Red (n=6) após 7 dias de incubação das células em meio osteogênico. Para isso, as células que permaneceram aderidas no fundo dos compartimentos foram fixadas com 200 µL de etanol 70% a 4°C por 1 hora, seguido de lavagem com 200 µL de água deionizada. Então, 100 µL da solução de Alizarin Red (40 mM, pH 4,2; Sigma-Aldrich Corp.) foi aplicada sobre as células, as quais foram mantidas por 15 minutos em incubadora sob agitação constante (TS-2000A VDRL Shaker, Biomex Biotecnologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil)⁶⁴. Após este período, as células foram lavadas com 1 mL de água deionizada e a formação de NM foi avaliada em microscópio de luz (Olympus BX51TF, Tóquio, Japão), sendo obtidas imagens representativas de cada grupo em 4x de aumento. Em seguida, para dissolução dos NM foi aplicado sobre as células 200 µL da solução de cloreto de cetilpiridíneo (10 mM; Sigma-Aldrich Corp.) por 15 minutos, sendo a absorbância da solução resultante avaliada em 560 nm (Synergy H1). Para esta análise, o grupo CN foi considerado como 100% de marcação⁶⁴.

4.1.11 Análise do pH

Corpos de prova foram preparados com os cimentos resinosos (n=4), utilizando para isso uma matriz metálica bipartida com 8 mm de diâmetro e 2 mm de altura⁶⁷, a qual foi posicionada entre duas lâminulas de vidro com 0,13 mm de espessura (Perfecta Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Com auxílio de uma pipeta de alta viscosidade (Gilson Incorporated), 120 µL de cada material foi inserido na matriz, cuja superfície superior e inferior foi isolada com tiras de poliéster (Quimidrol Ltda., Joinville, SC, Brasil) para evitar a inibição da polimerização por oxigênio⁶⁸. Em seguida, com o emprego de um aparelho fotopolimerizador de alta potência (VALO, Ultradent), os cimentos foram fotoativados, como previamente mostrado no Quadro 2 do item 4.1.4. Para este teste, corpos de prova dos sistemas adesivos (n=4) também foram preparados através da aplicação de 10 µL do produto sobre disco de papel filtro (J. Prolab) com 5 mm de diâmetro. Um leve jato de ar foi aplicado por 5 segundos para evaporação do solvente, e em seguida os agentes adesivos foram fotopolimerizados por 10 segundos⁶⁹. Os corpos de prova dos cimentos resinosos e agentes adesivos

foram individualmente posicionados na base de placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (Kasvi Imp.), onde foi aplicado 500 µL de meio de cultura (α-MEM; GIBCO) sem SFB. Como controle, o mesmo volume de α-MEM sem SFB, aplicado em compartimentos sem a presença de corpos de prova, foi usado. Então, o pH do meio de cultura em contato com os corpos de prova foi avaliado imediatamente e após os períodos de 1 e 24 horas, por meio de um pHmetro digital de bancada, ao qual estava acoplado um microelétrodo previamente calibrado (PHS3BW, Bel Engineering, Piracicaba, SP, Brasil). Durante as 24 horas a placa de acrílico foi mantida em incubadora em atmosfera com 5% de CO₂. O protocolo seguido para esta análise foi executado conforme as recomendações da ISO 10993-5:1999 (E)⁷⁰.

4.2 Fase 2: Avaliação do Grau de Conversão

4.2.1 Procedimento experimental

Para preparação das amostras (n=6), os cimentos resinosos foram manipulados sobre uma placa de vidro (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil), como recomendado pelo fabricante, e então inseridos em moldes bipartidos de aço inoxidável (1 mm de espessura x 4 mm de diâmetro interno) com auxílio de uma pipeta de alta viscosidade (Gilson Incorporated). Tiras de poliéster (Quimidrol Ltda.) foram posicionadas nas superfícies inferior e superior da amostra para evitar a inibição da polimerização por oxigênio⁶⁸. Para tentar padronizar a superfície de cada amostra, uma lâmina de vidro com 1 mm de espessura (Perfecta Ltda.) foi posicionada sobre o material. Em seguida, procedeu-se a fotopolimerização (VALO, Ultradent) dos materiais, com ou sem a interposição de uma faceta de cerâmica feldspática com 1 mm de espessura segundo as recomendações do fabricante (Quadro 4). Finalmente, todas as amostras dos cimentos resinosos foram armazenadas por 24 horas em ambiente sem luz, livre de umidade e na temperatura de 37°C⁷¹.

Quadro 4 - Grupos estabelecidos para realizar as avaliações do grau de conversão dos cimentos resinosos em teste

GRUPOS	Tempo de polimerização (segundos)
RelyX Veneer	30
Variolink Esthetic LC	20
Allcem Veneer APS	40
RelyX Veneer + Faceta cerâmica	30
Variolink Esthetic LC + Faceta cerâmica	20
Allcem Veneer APS + Faceta cerâmica	40

Fonte: Elaboração própria.

Em seguida, o grau de conversão (GC) dos materiais foi avaliado por meio da técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Para isso, foi utilizado um espectrofotômetro (VERTEX 70, Bruker Optics, Ettingen, Alemanha) equipado com um dispositivo de Refletância Total Atenuada (ATR), o qual é composto por um cristal de diamante (Platinum ATR-QL, Bruker Optics). A leitura preliminar de cada material não fotoativado foi registrada no espectro de absorbância obtido por varredura das amostras 32 vezes ao longo de uma faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} . Espectro adicional foi obtido do topo e da base das amostras fotoativadas dos cimentos resinosos em teste. A razão entre a ligação dupla carbono-carbono alifática (a 1.637 cm^{-1}) e o componente aromático (a 1.608 cm^{-1}) para amostras não-fotoativadas e fotoativadas foi usada para calcular o GC de acordo com a seguinte equação⁷¹:

$$GC = \left(1 - \frac{\text{absorbância } (1636\text{cm}^{-1}) / \text{absorbância } (1608\text{cm}^{-1}) \text{ polímero}}{\text{absorbância } (1636\text{cm}^{-1}) / \text{absorbância } (1608\text{cm}^{-1}) \text{ monômero}} \right) \times 100$$

4.3 Fase 3: Resistência de União à Dentina dos Cimentos Resinosos Fotoativados

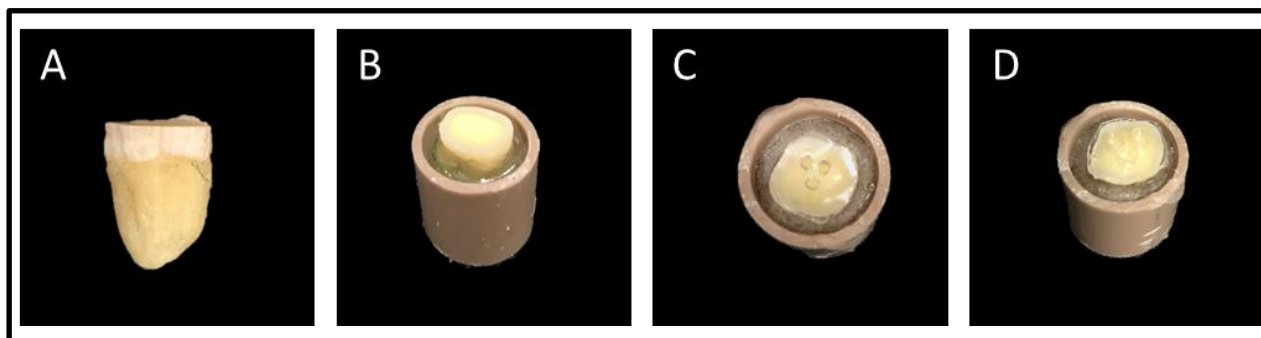
4.3.1 Confeção das amostras

Quarenta e oito terceiros molares humanos hígidos extraídos foram obtidos do banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição (CAAE: 14896319.2.0000.5416). Estes dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% (Sigma-Aldrich Corp.) sob refrigeração (4°C) até o momento de sua utilização.

Os dentes foram cortados transversalmente no terço oclusal da coroa, com a finalidade de produzir uma superfície plana em dentina. Estes cortes foram realizados com o auxílio de um disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltda.) acoplado numa cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda.), em contato com água destilada. As amostras obtidas foram incluídas em resina acrílica autopolimerizável (Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil). Para isso, foi usado como matriz um tubo cilíndrico de PVC (Tigre, Rio Claro, SP, Brasil) com 20 mm de diâmetro externo por 18 mm de altura, o que permitiu que a superfície de dentina fosse mantida centralizada e paralela à base do tubo⁶¹. Então, a superfície da dentina exposta foi desgastada com lixa de carbetto de silício com granulação 320 (Carborundum Abrasivos, Recife, PE, Brasil) posicionada em politriz (ERIOS – 27000, São Paulo, SP, Brasil). Este procedimento foi realizado sob refrigeração com água destilada por 60 segundos, com o objetivo de formar uma camada homogênea de smear layer sobre o substrato. Três perfurações padronizadas foram realizadas com um perfurador de lençol de borracha (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) numa fita adesiva dupla face ácido resistente (3M ESPE)⁶¹. Após aderir a fita sobre a dentina, as áreas delimitadas foram submetidas ao condicionamento com ácido fosfórico 37% (Condac 37, FGM) e lavagem com 2 mL de água destilada. Então, o excesso de água destilada foi removido com papel absorvente (J. Prolab) e em seguida foi aplicado o sistema adesivo recomendado pelo fabricante dos cimentos resinosos avaliados neste estudo. Então, matrizes cilíndricas transparentes de silicone (Tygon Tubing, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com 1 mm de altura e 1,5 mm de diâmetro interno foram

posicionadas sobre as três áreas expostas de dentina para inserção de quantidade padronizada dos materiais dentários em teste (Figura 4)^{23,72,73}.

Figura 4 - Confeção dos espécimes



A- Terceiro molar seccionado no terço oclusal; B- Inclusão em resina acrílica autopolimerizável; C- Delimitação de áreas em dentina; D- Matrizes de silicone posicionadas sobre as áreas delimitadas.

Fonte: Elaboração própria.

Cada cimento resinoso foi manipulado inserido nas matrizes de silicone com auxílio de uma pipeta de alta viscosidade (Gilson Incorporated). Então, os materiais foram fotopolimerizados diretamente ou através da interposição de uma faceta cerâmica (1 mm de espessura x 6 mm de diâmetro)²³. A irradiação foi realizada com um fotopolimerizador LED de alta potência (VALO, Ultradent), cuja irradiância foi avaliada com auxílio de um radiômetro (Radii Plus, SDI Limited) imediatamente antes e após a fotopolimerização dos materiais.

Os grupos estabelecidos para esta análise (n=8), bem como o protocolo de hibridização da dentina e aplicação dos cimentos resinosos, estão demonstrados no Quadro 5.

Quadro 5 - Grupos estabelecidos para realizar as avaliações da resistência de união à dentina dos cimentos resinosos em teste

GRUPOS	PROTOCOLOS
RelyX Veneer	Condicionar a dentina com ácido fosfórico (AF) 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar com disco de papel absorvente (PA), deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Single Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotopolimerizar. Aplicar o cimento resinoso sobre a dentina hibridizada e fotoativar por 30 s.
Variolink Esthetic LC	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Tetric N-Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Fotoativar o adesivo por 10 segundos. Aplicar o cimento resinoso sobre a dentina hibridizada e fotoativar por 20 s.
Allcem Veneer APS	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Ambar Universal APS por 10 s. Reaplicar o adesivo Ambar Universal ASP. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotoativar. Aplicar o cimento resinoso sobre a dentina hibridizada e fotoativar por 40 s.
RelyX Veneer + Faceta cerâmica	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Single Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotopolimerizar. Aplicar o cimento resinoso sobre a dentina hibridizada. Colocar faceta cerâmica sobre o cimento e fotoativar por 30 s.
Variolink Esthetic LC + Faceta cerâmica	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Tetric N-Bond Universal por 20 s. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Fotoativar o adesivo por 10 segundos. Aplicar o cimento resinoso sobre a dentina hibridizada. Colocar faceta cerâmica sobre o cimento e fotoativar por 20 s.
Allcem Veneer APS + Faceta cerâmica	Condicionar a dentina com AF 37% por 15 s. Lavar a superfície com 2 mL de água destilada, sugando simultaneamente. Secar a superfície oclusal com disco de PA, deixando-a levemente úmida. Aplicar ativamente 5 µL do adesivo Ambar Universal APS por 10 s. Reaplicar o adesivo Ambar Universal ASP. Evaporar o solvente com jato de ar por 5 s. Não fotoativar. Aplicar o cimento resinoso sobre a dentina hibridizada. Colocar faceta cerâmica sobre o cimento e fotoativar por 40 s.

Fonte: Elaboração própria.

As amostras foram colocadas em recipiente hermético (Tupperware Brands Corporation, Orlando, FL, EUA), cuja base foi forrada com tecido de algodão estéril (Apolo, Cataguases, MG, Brasil) umidificado com água destilada. O recipiente foi

envolto em papel-alumínio (Thermopratt, Jerinu, SP, Brasil) e mantido em ambiente escuro e úmido a 37°C durante 24 horas (Qualxtron, São Paulo, Brasil, SP). Em seguida, as matrizes de silicone dos espécimes de cada dente foram cortadas com auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Embramed, Jurubatuba, SP, Brasil) e removidas para permitir a realização do teste de resistência à tração (microcissalhamento)⁶¹.

O ensaio de microcissalhamento foi realizado em máquina para testes mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil), previamente ajustada para forças de tração. Para a execução do teste, após a remoção das matrizes de silicone, o troquel de PVC foi cuidadosamente alinhado e um fio metálico de 0,2 mm de diâmetro (Morelli Ortodontia; Sorocaba, SP, Brasil) foi aplicado, laçando simultaneamente o espécime o mais próximo possível da união material/dentina e o prolongamento da célula de carga. Os movimentos de tração foram realizados utilizando célula de carga de 200 N a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os testes foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e prosseguiu até que ocorresse a fratura. A resistência de união ao microcissalhamento foi calculada dividindo-se a força máxima registrada durante o ensaio (em N) pela área de união (em mm²) e expressa em MPa⁶¹.

4.4 Análise Estatística

Os dados obtidos dos testes de citotoxicidade transdentinária e os valores de grau de conversão, bem como de resistência de união à dentina dos cimentos resinosos fotoativados utilizados neste estudo foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias dos grupos foi comparada pelo teste de Levene. Em seguida, os dados obtidos foram submetidos a análise de variâncias ANOVA a um critério, complementado pelo pós-teste de Tukey. Os valores obtidos pela análise de pH foram submetidos a ANOVA a dois critérios, complementado pelo pós-teste de Tukey. Todos os testes estatísticos empregaram o nível de significância de 5%.

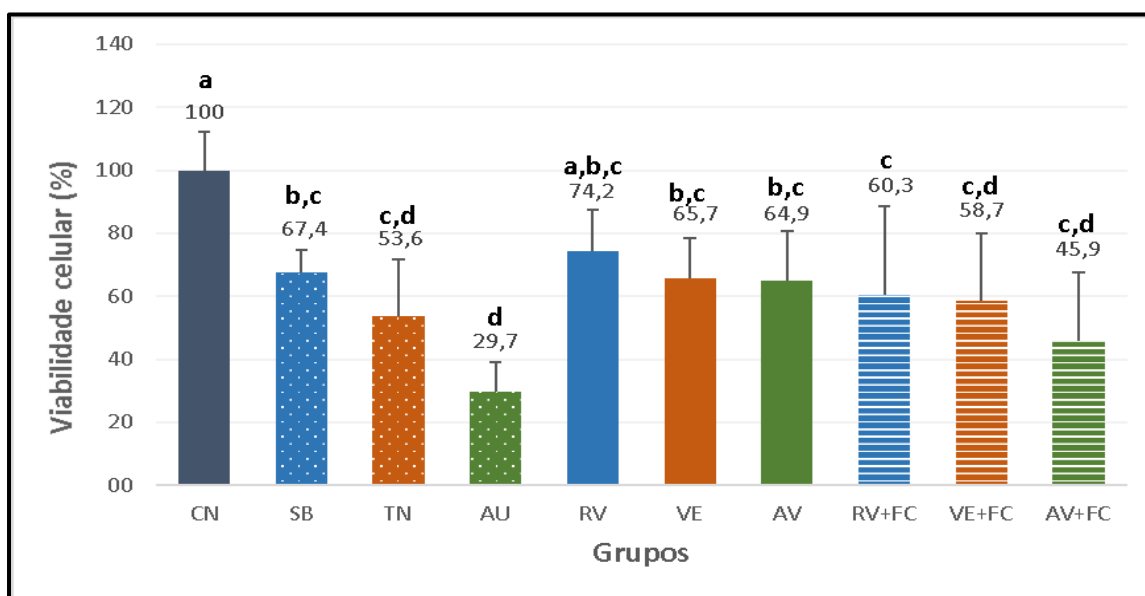
5 RESULTADOS

5.1 Fase 1: Citotoxicidade Transdentinária dos Cimentos Resinosos

5.1.1 Viabilidade das células MDPC-23 cultivadas na superfície pulpar de discos de dentina (Alamar Blue)

Com exceção do grupo RV, onde o cimento RelyX Veneer foi aplicado sobre a dentina previamente hibridizada com o sistema adesivo Single Bond Universal, todos os sistemas adesivos usados individualmente (grupos SB, TN e AU) ou em associação com os cimentos resinosos polimerizados diretamente (grupos VE e AV) ou através da interposição da faceta cerâmica (grupos RV+FC, VE+FC e AV+FC), causaram redução significativa na viabilidade das células pulpares MDPC-23 em comparação ao grupo controle negativo (CN; $p < 0,05$). Porém, apenas nos grupos AU e AV+FC foi observado que as células tiveram mais de 50% de sua viabilidade reduzida. A interposição da faceta cerâmica entre os cimentos resinosos e a fonte de luz não influenciou os resultados de viabilidade celular quando todos os cimentos foram associados aos seus respectivos sistemas adesivos ($p > 0,05$).

Figura 5 - Viabilidade das células MDPC-23



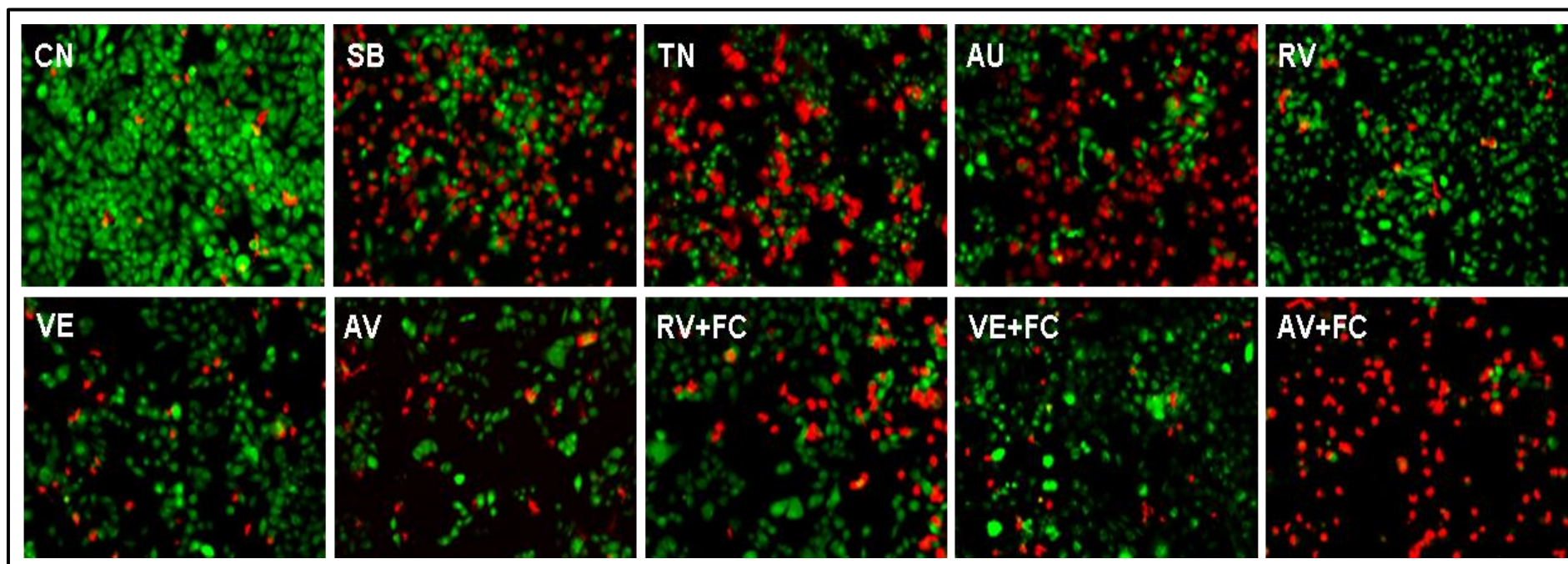
Média e desvio padrão dos valores de viabilidade (%) das células odontoblastóides MDPC-23 semeadas sobre a superfície pulpar dos discos de dentina e submetidas ao ensaio de Alamar Blue. Diferentes letras demonstram diferença significativa entre os grupos. (n=6; ANOVA one-way e Tukey; $\alpha = 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.1.2 Viabilidade das células MDPC-23 cultivadas nos compartimentos das placas de acrílico e expostas aos extratos (Live/Dead)

As fotomicrografias do ensaio de Live/Dead para todos os grupos estão apresentadas na Figura 6. Vinte e quatro horas após o contato das células MDPC-23 com os extratos dos materiais avaliados, foi observado menor número de células vivas, marcadas com Calcein AM (verde), e maior quantidade de células mortas, marcadas com EthD-1 (vermelho), para todos os grupos em comparação ao controle negativo- CN (sem tratamento). Porém, no grupo RV, um maior número de células marcadas com Calcein AM permaneceu aderida ao substrato de acrílico. Imagens semelhantes foram observadas nos grupos onde os sistemas adesivos foram aplicados individualmente sobre a dentina (SB, TN e AU). Nesses grupos específicos, a análise subjetiva das imagens permitiu determinar que houve equilíbrio entre células mortas e vivas. Numa avaliação comparativa entre os grupos RV+FC, VE+FC e AV+FC, onde facetas de porcelana foram interpostas entre os materiais resinosos e a fonte de luz, este último grupo apresentou o maior número de células mortas. De maneira geral, o grupo AV+FC foi àquele onde as células MDPC-23 sofreram o maior efeito tóxico transdentinário.

Figura 6 - Fotomicrografias representativas do ensaio de Live/Dead. Microscopia de fluorescência (10x)

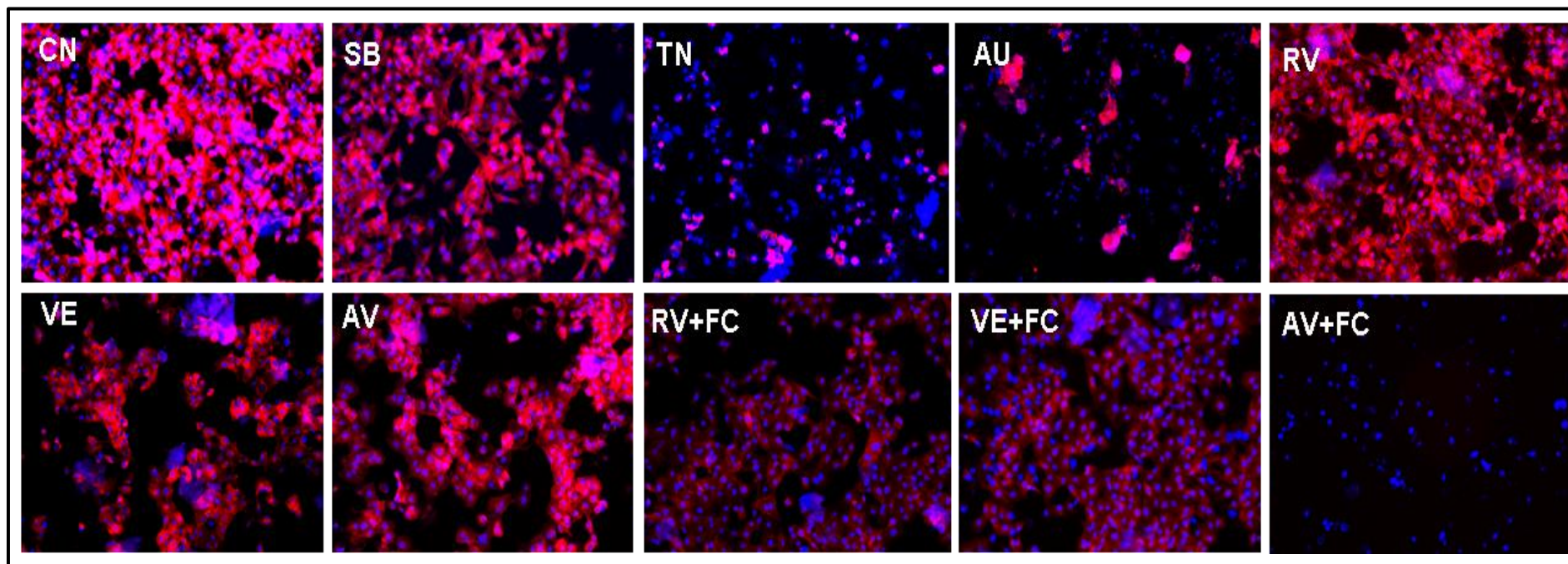


Fluorescência verde (Calcein AM) indica a presença de células vivas e fluorescência vermelha (EthD-1) indica a presença de células mortas.
Fonte: Elaboração própria.

5.1.3 Adesão e espalhamento das células MDPC-23 expostas aos extratos (F-actina)

Após 24 horas de exposição das células aos extratos obtidos dos sistemas adesivos e cimentos resinosos, foram obtidas fotomicrografias representativas de cada grupo (Figura 7), onde o citoesqueleto das células foi marcado com Actin Red 555 (vermelho) e o núcleo com Hoescht (azul). No grupo CN, onde nenhum tratamento foi realizado sobre os discos de dentina, um maior número de células permaneceu aderido no fundo do compartimento. Entre todos os grupos experimentais estabelecidos neste estudo, o grupo RV foi aquele que apresentou o maior número de células aderidas e espalhadas sobre o substrato de acrílico. Tal como observado no teste de Live/Dead, o menor número de células, as quais praticamente não exibiam citoesqueleto evidenciado, ocorreu no grupo AV+FC. Numa análise comparativa entre os grupos nos quais os materiais resinosos foram fotopolimerizados diretamente (RV, VE e AV) ou com a interposição de facetas de cerâmica (RV+FC, VE+FC e AV+FC), foi possível determinar que nesta última condição, um menor número de células permaneceu aderido no fundo do compartimento. Este resultado parece corroborar com aquele obtidos por meio do teste de Live/Dead.

Figura 7 - Fotomicrografias representativas do ensaio de coloração dos filamentos de actina. Microscopia de fluorescência (10x).

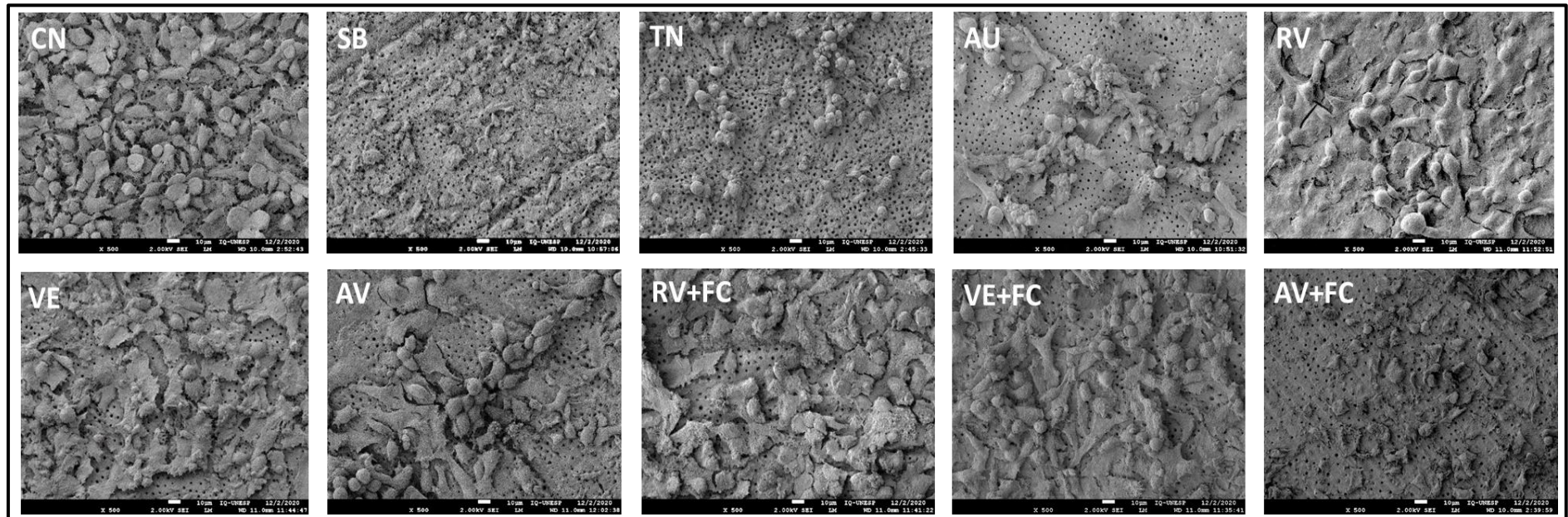


Fluorescência vermelha indica o citoesqueleto das células (Actin Red 555). Fluorescência azul indica o núcleo das células (Hoechst).
Fonte: Elaboração própria.

5.1.4 Avaliação da morfologia das células MDPC-23 cultivadas sobre a superfície pulpar dos discos de dentina (MEV)

A característica morfológica das células MDPC-23 semeadas na superfície pulpar dos discos de dentina, e cuja superfície oclusal deles foi tratada ou não com os materiais em teste, estão apresentadas na Figura 8. No grupo controle negativo (CN), onde nenhum tratamento foi realizado, observou-se que um grande número de células, com características de normalidade, permaneceram aderidas de maneira uniforme sobre o substrato dentinário. Nos grupos onde foram aplicados os sistemas adesivos (grupos SB, TN e AU), a superfície pulpar dos discos de dentina apresentava importante redução no número de células, as quais exibiam menor tamanho. Assim, amplas áreas do substrato com túbulos dentinários expostos foram observadas. Quando os cimentos foram fotopolimerizados sem a interposição da faceta cerâmica (grupos RV, VE e AV), poucas células odontoblastóides MDPC-23 se deslocaram da superfície pulpar dos discos de dentina. Estas células, especialmente no grupo RV, exibiam amplo citoplasma e recobriam o substrato, semelhante ao observado no grupo CN. O menor número de células pulpares sobre a dentina ocorreu no grupo AV. Nos grupos RV+FC e VE+FC, onde a polimerização foi realizada após interposição de uma faceta cerâmica entre a fonte de luz e os materiais, o número e morfologia das células MDPC-23 que permaneceram sobre a dentina foram semelhantes ao observado nos seus respectivos grupos fotoativados diretamente (RV e VE). Porém, muitas células se deslocaram do substrato quando o cimento Allcem Veneer APS foi indiretamente polimerizado (grupo AV+FC). As poucas células pulpares que permaneceram aderida à superfície pulpar dos discos de dentina exibiam tamanho menor do que observado nos demais grupos experimentais e controle.

Figura 8 - Eletromicrografias representativas dos grupos experimentais e controle (MEV, magnificação original x500).



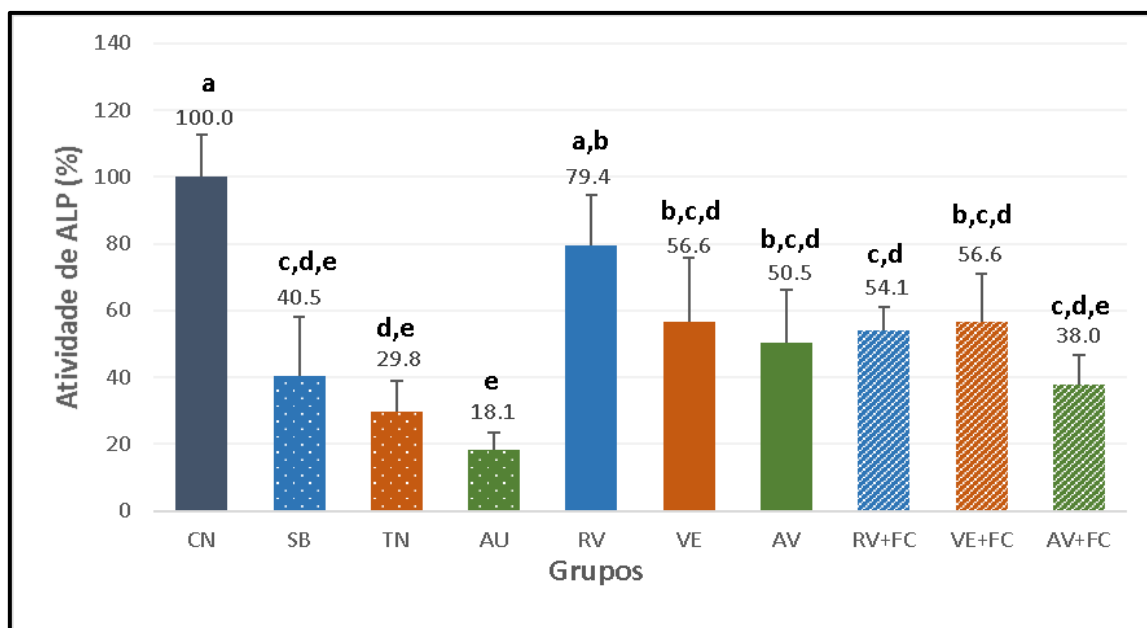
CN (controle negativo)- Muitas células MDPC-23 com amplo citoplasma estão homogeneamente distribuídas sobre a superfície pulpar do disco de dentina. SB (Single Bond Universal), TN (Tetric N-Bond Universal), e AU (Ambar Universal): Grande quantidade de células se deslocaram do substrato, o qual exibe numerosos túbulos dentinários expostos. Note que as poucas células que permaneceram aderidas à dentina apresentam tamanho menor em comparação ao grupo CN. RV (RelyX Veneer) e VE (Variolink Esthetic LC)- Muitas células com amplo citoplasma permaneceram aderidas sobre a dentina. AV (Allcem Veneer APS)- Apesar das células MDPC-23 exibirem morfologia próxima da normalidade, um menor número delas se manteve aderido sobre a dentina, a qual exibe muitos túbulos expostos. RV+FC (RelyX Veneer + Faceta Cerâmica) e VE + FC (Variolink Esthetic LC + Faceta Cerâmica): A morfologia e número de células aderidas a superfície pulpar dos discos de dentina foram semelhantes aos grupos RV e VE. AV+FC (Allcem Veneer + Faceta cerâmica)- A contração citoplasmática das poucas células MDPC-23 que permaneceram sobre o substrato dentinário, fez com que elas apresentassem tamanho reduzido em comparação aos demais grupos experimentais e controle. Esta alteração morfológica celular e o extenso deslocamento das células MDPC-23 do substrato, fizeram com que um grande número de túbulos dentinários fossem expostos.

Fonte: Elaboração própria.

5.1.5 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, após 5 dias de exposição das células MDPC-23 aos extratos obtidos dos materiais avaliados, houve redução significativa da atividade de ALP para todos os grupos em comparação ao CN, com exceção do grupo RV ($p < 0,05$). As células dos grupos SB, TN, AU e AV+FC mostraram reduzida atividade de ALP (maior que 50%). Apenas para o grupo RV, a interposição da faceta cerâmica entre o material resinoso e a fonte de luz reduziu significativamente a atividade ALP das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao fundo do compartimento ($p < 0,05$). Tal como observado nos testes de Live/Dead e f-actina, os menores valores de atividade celular tenderam a ocorrer nos grupos onde o sistema adesivo Ambar Universal APS foi usado individualmente ou associado ao cimento resinoso Allcem Veneer APS (AU, AV e AV+FC).

Figura 9 - Atividade de ALP



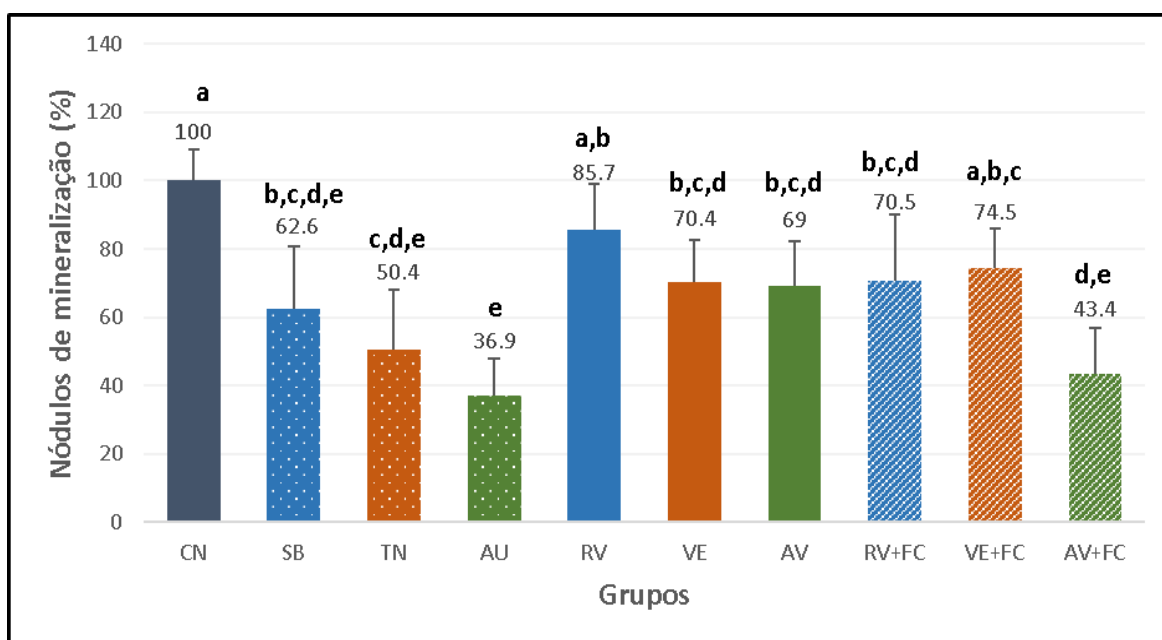
Média e desvio padrão dos valores de atividade de ALP pelas células odontoblastóides MDPC-23. Diferentes letras demonstram diferença significativa entre os grupos. ($n=4$; ANOVA one-way/Tukey; $\alpha=0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.1.6 Deposição de nódulos de mineralização (Alizarin Red)

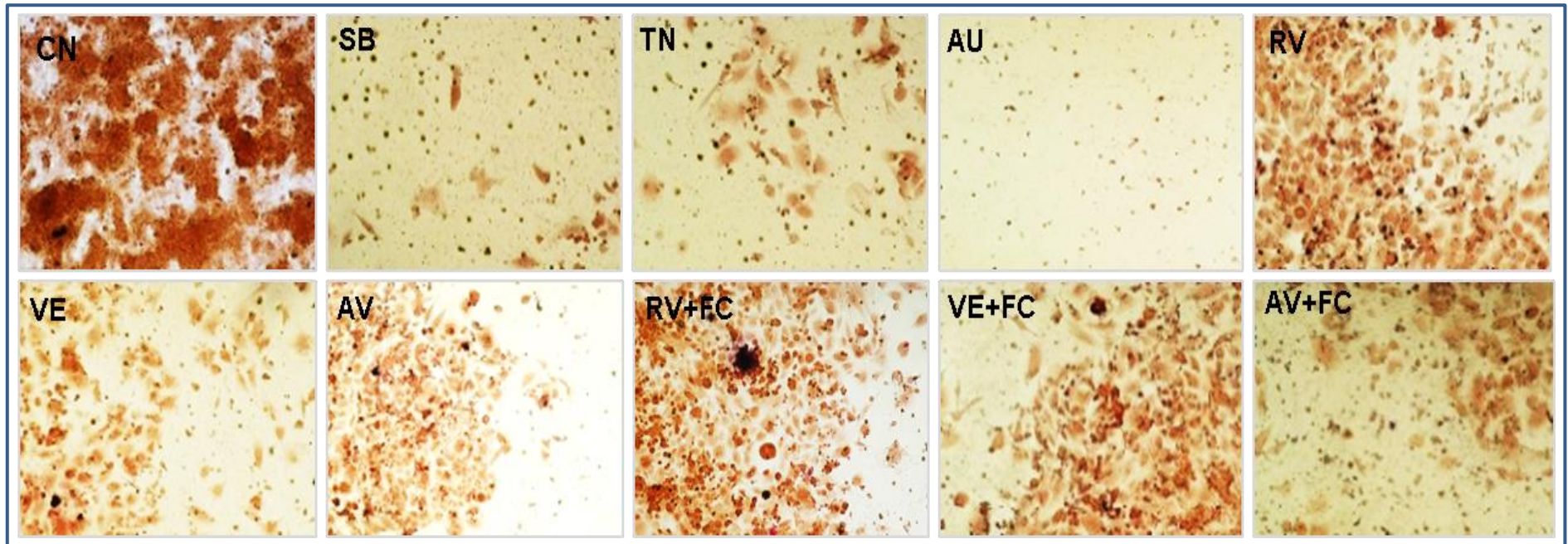
Os resultados de deposição de nódulos de mineralização (NM) pelas células odontoblastóides MDPC-23 estão apresentados na Figura 10. Após 7 dias de exposição das células aos extratos, foi observado redução significativa de NM em todos os grupos experimentais em relação ao CN, com exceção do grupo RV ($p < 0,05$). Porém, apenas AU e AV+FC apresentaram valores de deposição de matriz mineralizada menores que 50%. Nestes dois grupos, o sistema adesivo Ambar Universal APS foi usado individualmente ou associado ao cimento resinoso Allcem Veneer APS. Para este teste laboratorial específico, a interposição de faceta cerâmica entre os materiais resinosos e a fonte de luz não influenciou significativamente a deposição de NM pelas células pulpares ($p > 0,05$). Esses dados são corroborados pelas imagens nos nódulos de mineralização obtidas por meio da realização do ensaio de Alizarin Red (Figura 11).

Figura 10 - Deposição de nódulos de mineralização



Média e desvio padrão dos valores de formação de nódulos de mineralização (%) dos grupos estabelecidos neste estudo. Diferentes letras demonstram diferença significativa entre os grupos. (n=4; ANOVA one-way/Tukey; $\alpha=0,05$).
Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 - Imagens representativas da deposição de NM (Alizarin Red) para todos os grupos estabelecidos neste estudo (microscopia de luz invertida, aumento original x10).



Note a intensa deposição de NM (setas) no grupo controle (CN), sendo que esta atividade celular foi reduzida em todos os demais grupos do estudo. De maneira geral, os menores valores de deposição de NM foram determinados nos grupos SB, TN e AU, bem como no grupo AV+FC.

Fonte: Elaboração própria.

5.1.7 Análise do pH

O pH do meio de cultura que permaneceu em contato com os corpos de prova fotoativados dos materiais avaliados na presente pesquisa (extratos), foi aferido três vezes ao longo de 24 horas (n=4) (Figura 12). Imediatamente, após 12 e após 24 horas, o pH do grupo controle (MC), cujo meio de cultura não entrou em contato com nenhum material apresentou média de 8,4; 8,0; 8,2, respectivamente. Na análise imediata, os sistemas adesivos reduziram consideravelmente o pH do meio de cultura em comparação ao MC (SB - 7,5; TN - 7,6; AU - 7,5), sendo que esse padrão se repetiu para as análises de 12 horas (SB - 7,2; TN - 7,3; AU - 7,6) e 24 horas (SB - 6,8; TN - 7,0; AU - 7,4). Dentre esses grupos, SB apresentou maior redução do pH, seguido por TN e por último AU. O pH dos extratos em contato com os cimentos resinosos durante a análise imediata foi semelhante para todos os grupos e não diferiu do controle (RV - 8,4; VE - 8,4; AV - 8,4). Entretanto, após 12 e 24 horas, RV apresentou menores valores de pH, seguido por VE e AV, sendo que as médias de cada grupo foram: RV - 7,4; VE - 7,6; AV - 7,9 e RV - 7,6; VE - 8,0; AV - 7,9, na devida ordem.

Figura 12 - Análise do pH

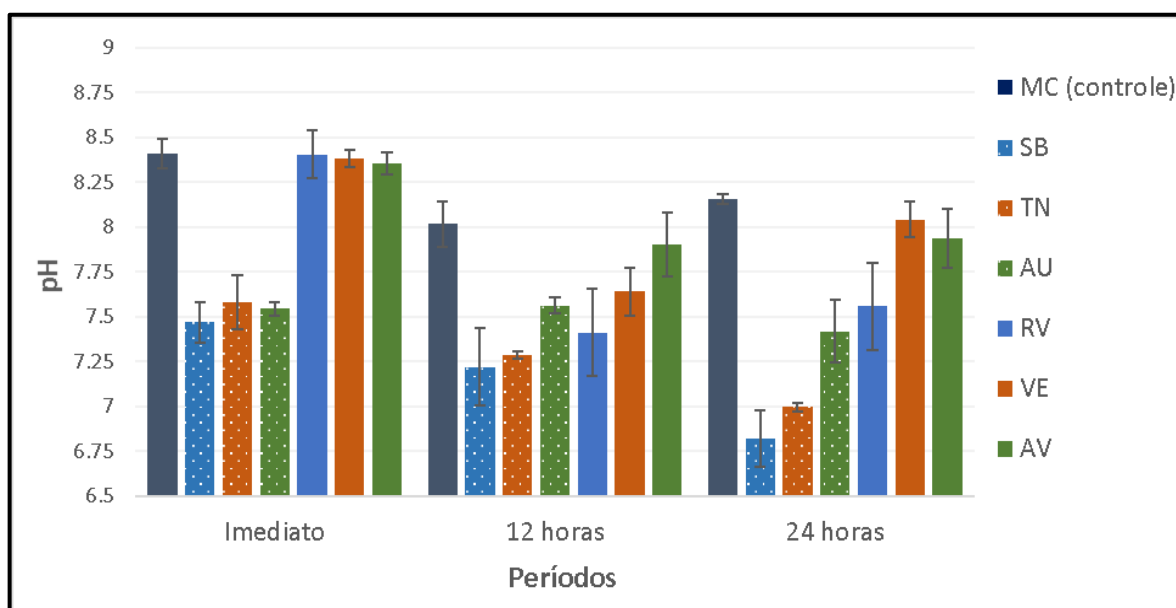


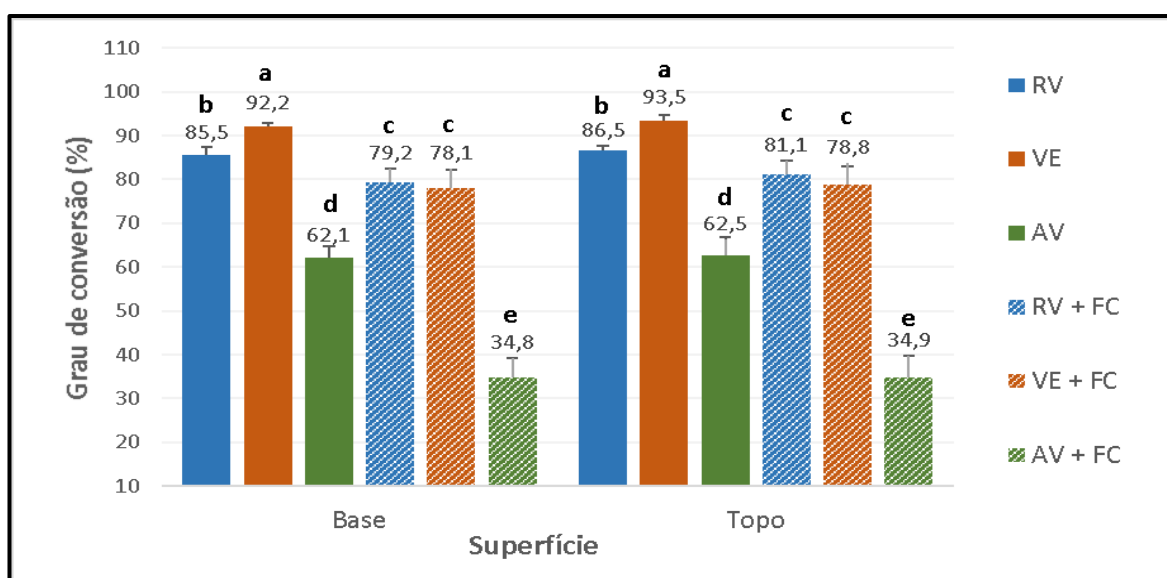
Gráfico demonstrativo dos valores de pH dos extratos obtidos nos diferentes momentos de imersão dos corpos de prova no meio de cultura (n=4). Barras representam os intervalos de confiança.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Fase 2: Avaliação do Grau de Conversão

Nesta análise, leituras do topo (T) e da base (B) das amostras fotoativadas dos cimentos resinosos foram obtidas para calcular as médias do grau de conversão (GC), cujos resultados estão apresentados na Figura 13. O GC determinado no topo das amostras foi ligeiramente maior para todos os grupos experimentais, em comparação a base, porém sem diferenças estatisticamente significantes. Os valores de GC obtidos nos grupos fotoativados sem a interposição da faceta cerâmica com 1 mm espessura, foram significativamente mais elevados do que àqueles onde os materiais foram fotoativados através da cerâmica ($p < 0,05$). Dentre os cimentos avaliados sem a presença da faceta cerâmica, o maior GC foi observado para VE (T: $93,5 \pm 1,1\%$; B: $92,2 \pm 0,6\%$), seguido por RV (T: $86,5 \pm 1,3\%$; B: $85,5 \pm 1,8\%$). Entretanto, quando a faceta cerâmica foi usada, o grupo RV+FC (T: $81,1 \pm 3,2\%$; B: $79,2 \pm 3,1\%$) apresentou GC com tendência a ser superior ao VE+FC (T: $78,8 \pm 4,2\%$; B: $78,1 \pm 4,0\%$), porém sem ter sido observado diferença significativa entre eles. O menor GC foi observado para o cimento AV com ou sem a presença da faceta cerâmica, para esses grupos o GC obtido foi AV (T: $62,5 \pm 4,3\%$; B: $62,1 \pm 2,5\%$) e AV+FC (T: $34,9 \pm 4,8\%$; B: $34,8 \pm 4,3\%$).

Figura 13 - Avaliação do grau de conversão



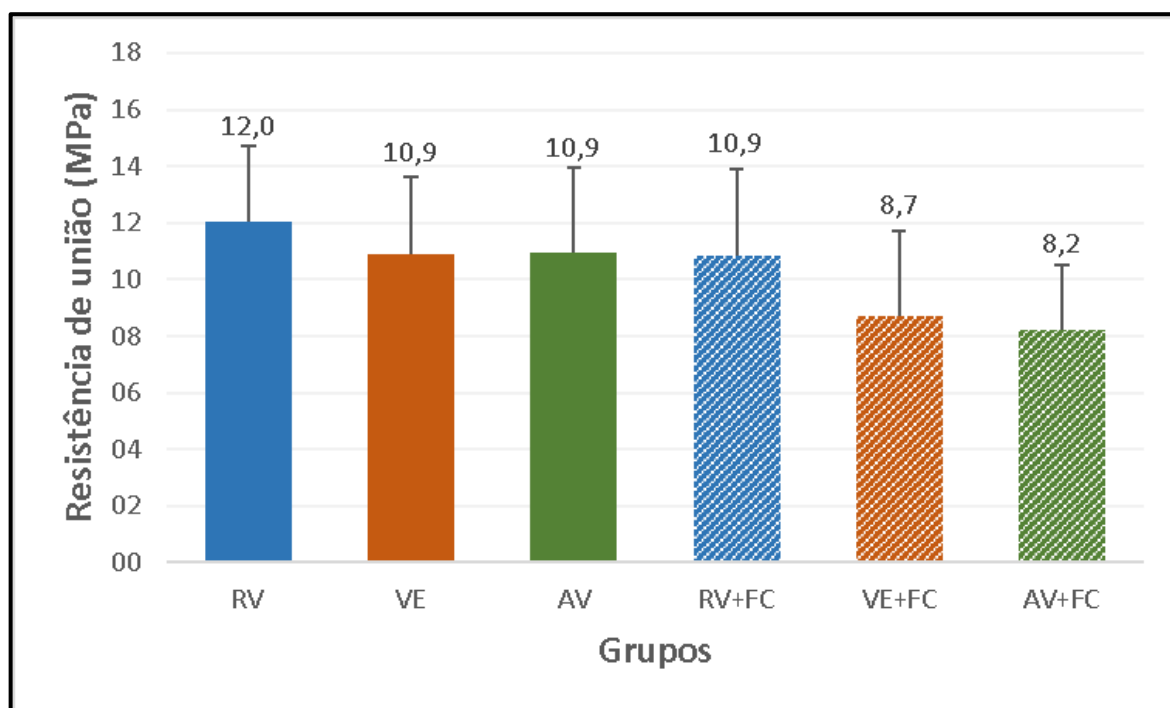
Grau de conversão (%) das superfícies (base e topo) de amostras de cimentos resinosos fotoativados. Barras e números representam médias e desvios-padrão, respectivamente ($n=6$). Letras diferentes demonstram diferenças estatísticas entre os grupos. Não houve efeito da superfície e a presença da faceta cerâmica resultou em menor grau de conversão (ANOVA a dois fatores/Tukey $p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Fase 3: Resistência de União à Dentina dos Cimentos Resinosos Fotoativados

Tal como apresentado na Figura 14, os resultados do teste One-Way ANOVA mostraram que não houve diferença significativa nos valores de resistência de união à dentina quando todos os cimentos resinosos polymerizados diretamente foram comparados entre si ($p>0.05$). Apesar das maiores médias de resistência de união à dentina terem sido observadas quando os cimentos resinosos foram fotoativados diretamente, a interposição da faceta cerâmica não influenciou significativamente nesta propriedade dos materiais em teste.

Figura 14 - Resistência de união à dentina dos cimentos resinosos fotoativados



Média e desvio padrão dos valores de resistência de união à dentina dos cimentos resinosos quando do emprego do teste de microcisolamento (MPa). (ANOVA One-Way; $p>0.05$; $n=8$).
Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Para conferir retenção entre restaurações indiretas e o substrato dental, agentes específicos de cimentação são usados para preencher o exíguo espaço entre o dente preparado e a peça protética⁷⁴. Edelhoff e Özcan⁷⁵ relataram que dentre diversos fatores, a correta seleção do agente de cimentação tem papel fundamental na longevidade do tratamento realizado. No presente estudo, três cimentos resinosos fotoativados de diferentes marcas comerciais foram usados para cimentação de facetas de cerâmica feldspática com 1 mm de espessura. A escolha desses materiais resinosos (agentes de união) ocorreu devido às suas excelentes propriedades estéticas e mecânicas⁴⁸, bem como por estes produtos dependerem unicamente da luz para iniciar a reação de polimerização, o que faz com que sejam amplamente recomendados para cimentação de peças protéticas delgadas e translúcidas⁷⁶.

Sabe-se que os odontoblastos, células típicas da polpa que se organizam em monocamada (camada odontoblástica) para revestir internamente a dentina coronária e radicular⁷⁷, são responsáveis pela manutenção e equilíbrio deste tecido dentário permeável⁷⁸. Durante a odontogênese, a medida em que os odontoblastos sintetizam e depositam matriz dentinária, eles se movem centripetamente com relação a papila dentária. Consequentemente, este curso das células faz com que elas deixem atrás de seu corpo em movimento, prolongamentos citoplasmáticos que permanecem no interior da dentina após sua mineralização, conferindo a este substrato uma morfologia tubular⁷⁹. Desta forma, a origem e a íntima relação entre polpa dental e dentina faz com que estes dois tecidos sejam considerados como uma estrutura única, então denominada de complexo dentina-polpa^{80,81}. Portanto, tão relevante quanto entender o comportamento mecânico, físico e óptico dos materiais dentários aplicados sobre esmalte e dentina, é fundamental também, avaliar os efeitos biológicos causados por eles e suas técnicas de aplicação¹⁵. Baseado no fato de que os odontoblastos são as primeiras células da polpa a entrar em contato com componentes dos materiais dentários capazes de se difundir pelo esmalte e o substrato dentinário tubular, células odontoblastóides MDPC-23 foram selecionadas para uso na presente pesquisa. Com o objetivo de simular condições clínicas, esta linhagem celular tem sido amplamente empregada para avaliar e comparar a citotoxicidade indireta de variados produtos^{26,64,65,69,82}.

Dentre os testes realizados no presente estudo, o efeito citotóxico transdentinário de cimentos resinosos sobre células MDPC-23 semeadas em discos de dentina e em placas de acrílico, foi avaliado. Considerando que barreiras dentinárias com 0,4 mm de espessura ou mais podem reduzir o efeito citotóxico de materiais dentários^{61,83,84}, discos de dentina padronizados quanto a espessura e permeabilidade, os quais foram adaptados em câmara pulpares artificiais, foram utilizados na presente pesquisa. Pahlevan et al.⁸⁵ relataram que, dependendo da técnica empregada no preparo mecânico de dentes anteriores para receberem restaurações do tipo facetas, áreas de dentina podem ser expostas na região cervical, onde a espessura do esmalte é delgada e esta região encontra-se próxima a polpa dental. Assim, com a proposta de avaliar a citotoxicidade transdentinária de cimentos resinosos numa condição de grande desafio, simulando uma situação clínica de dentina profunda, onde o remanescente dentinário tem espessura inferior a 0,5 mm⁸⁶, discos de dentina com 0,4 mm de espessura foram usados no presente estudo. Desse modo, para executar este teste biológico específico, os cimentos foram aplicados sobre a superfície oclusal dos discos de dentina, a qual foi previamente hibridizada, tal como recomendado pelos fabricantes. Em cada grupo experimental, os cimentos resinosos foram irradiados diretamente ou através da interposição de uma faceta de cerâmica (1 mm de espessura) entre eles e a fonte de luz. Como grupos controle positivos e negativo deste estudo, os sistemas adesivos recomendados pelos respectivos fabricantes dos cimentos resinosos foram usados isoladamente, ou nenhum tratamento foi realizado, respectivamente.

Tradicionalmente, os materiais à base de resina, tal como os sistemas adesivos e cimentos resinosos avaliados no presente estudo, contêm monômeros em sua composição^{33,51}. Considerando o fato de que durante a reação de polimerização não há uma completa conversão dos monômeros em cadeias poliméricas, monômeros livres não reagidos permanecem na superfície dos materiais resinosos⁸⁷. Quando estes materiais entram em contato com soluções aquosas, tal como saliva humana e fluído dentinário, os monômeros livres não reagidos são lixiviados^{88,89} e assim podem entrar em contato com os tecidos adjacentes. Dependendo da quantidade de monômeros lixiviados dos materiais resinosos, estes podem causar toxicidade de variada intensidade sobre células da mucosa oral ou polpa^{15,30,86}. Os monômeros livres também podem causar danos ao DNA celular⁹⁰, morte celular por

apoptose⁹¹ e influenciar a resposta celular do sistema imune inato⁹². Também foi demonstrado que monômeros livres que se difundem pela dentina podem interferir no metabolismo dos odontoblastos, inibindo algumas funções específicas, tais como síntese de fosfatase alcalina, capacidade de deposição de matriz rica em colágeno e expressão gênica de marcadores específicos envolvidos na regeneração pulpar^{69,93}. Bakopoulou et al.^{94,95} relataram que esses monômeros ainda podem atrasar o processo de diferenciação odontogênica de células mesenquimais da polpa, o que interfere diretamente no mecanismo de cura deste tecido conjuntivo especializado.

Muitos cimentos resinosos convencionais, usados para cimentação de peças protéticas, requerem a prévia hibridização da dentina, a qual é comumente condicionada com ácido fosfórico antes da aplicação do agente adesivo. O condicionamento da dentina com agentes ácidos desmineraliza parcialmente o substrato e remove a smear layer⁷⁹. Esse procedimento expõe uma rede de fibrilas de colágeno e túbulos dentinários, favorecendo a penetração do agente adesivo no substrato desmineralizado⁹⁶. No entanto, moderado-intenso efeito citotóxico transdentinário foi observado quando sistemas adesivos convencionais foram aplicados sobre discos de dentina condicionados com ácido e cuja espessura era menor ou igual a 0,5 mm^{61,83,84}. A remoção da smear layer e o aumento no diâmetro dos túbulos dentinários, causados pela ação dos agentes ácidos, permite rápida difusão de componentes tóxicos liberados dos materiais resinosos em direção ao espaço pulpar^{84,97}. Em estudo in vivo, de Souza Costa et al.³⁷ observaram a formação de longos tags de resina nos túbulos dentinários e moderada desorganização e inflamação pulpar, quando um sistema adesivo de frasco único foi aplicado em cavidades profundas submetidas ao prévio condicionamento ácido. Na presente pesquisa, sistemas adesivos aplicados isoladamente sobre dentina condicionada causaram redução significativa na viabilidade das células MDPC-23. Portanto, é possível sugerir que monômeros livres não reagidos tenham sido liberados dos sistemas adesivos e parte deles tenha difundido através dos túbulos dentinários, alcançando rapidamente as células odontoblastóides semeadas na superfície pulpar dos discos. Para realizar os testes complementares propostos neste estudo, os quais requerem tempos mais longos de cultura celular, os extratos de cada grupo foram coletados e aplicados sobre células MDPC-23 previamente cultivadas em compartimentos de placas de acrílico esterilizadas. De maneira geral, além de

interferir na expressão fenotípica das células, as imagens obtidas através do ensaio de Live/Dead permitiram demonstrar, de modo qualitativo, que os produtos presentes nos extratos reduziram a quantidade de células vivas. O ensaio de F-actina demonstrou a ocorrência de alterações no padrão de adesão e espalhamento celular e redução na quantidade de células MDPC-23 aderidas na base dos compartimentos.

Para que uma adequada interação ocorra entre sistemas adesivos e dentina, monômeros diluentes e de baixa viscosidade, tais como o HEMA e TEGDMA, são adicionados a esses materiais resinosos⁹⁸. Entretanto, devido ao baixo peso molecular e hidrofília, esses componentes são lixiviados com maior facilidade em comparação a monômeros com maior peso molecular e de natureza hidrófoba, como o BISGMA e UDMA^{89,99}. Em estudo recente de Baldion et al.¹⁰⁰, foi demonstrado que a exposição de células odontoblastóides humanas (hOLCs) ao HEMA e TEGDMA por 24 horas, induziu alterações na atividade metabólica e integridade da membrana celular. Os autores também observaram produção aumentada e precoce de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), o que resultou em peroxidação dos lipídios da membrana, alteração severa na atividade mitocondrial e modificações no potencial redox das células. De acordo com os resultados do presente estudo, dentre os sistemas adesivos investigados, o AU apresentou maior citotoxicidade transdentinária sobre células odontoblastóides MDPC-23, reduzindo a viabilidade celular em 70,3%, bem como a atividade de ALP e formação de nódulos de mineralização em 81,9% e 63,1%, respectivamente. Apesar do fabricante desse material não especificar quais monômeros estão presentes no produto, foi possível constatar, durante sua manipulação, que ele é menos viscoso do que os demais sistemas adesivos usados nesta pesquisa. Essa característica permite sugerir que alguns monômeros, como o HEMA e TEGDMA, os quais conferem baixa viscosidade aos materiais resinosos, podem fazer parte da composição química do AU. O efeito citotóxico observado no presente estudo para o sistema adesivo AU, também pode estar relacionado ao protocolo de uso desse material. Enquanto uma única camada de SB e TN foi usada para hibridizar a dentina condicionada, duas camadas do sistema AU foram aplicadas, tal como recomendado pelo fabricante. Leite et al.⁶¹ demonstraram que a aplicação ativa de duas camadas consecutivas de sistemas adesivos para hibridizar discos de dentina condicionados com ácido fosfórico 37%, reduziu em torno de 88% a viabilidade de células MDPC-23. Assim, é possível sugerir que a aplicação de duas

camadas do sistema adesivo AU (baixa viscosidade) sobre dentina previamente condicionada com ácido, pode ter resultado em intensa difusão transdentinária de componentes tóxicos liberados pelo material resinoso. Consequentemente, a elevada concentração desses componentes acumulada no espaço pulpar parece ter determinado a maior citotoxicidade do AU em comparação aos demais sistemas adesivos usados neste estudo laboratorial.

Ao avaliar a citotoxicidade dos protocolos de cimentação, foi possível observar que todos os cimentos fotoativados através da interposição de uma faceta de cerâmica entre eles e a fonte de luz, reduziram a viabilidade, bem como a expressão de marcadores da síntese e deposição de matriz mineralizada pelas células MPDC-23. Ainda, esses protocolos alteraram o padrão de morfologia, adesão e espalhamento celular em relação ao grupo controle negativo, onde nenhum tratamento foi realizado. Garcia et al.²⁶ investigaram a citotoxicidade transdentinária de diferentes cimentos à base de resina (cimento resinoso dual convencional, cimento resinoso dual auto-condicionante e cimento ionomérico modificado por resina) em contato com células MDPC-23 e HDPCs. Os autores observaram maior redução de viabilidade sobre ambas as linhagens celulares para o cimento resinoso convencional testado. de Souza Costa et al.¹⁴ avaliaram a resposta de polpas humanas após cimentação de restaurações inlay em cavidades de classe V confeccionadas na face vestibular de pré-molares. Foi demonstrado, por meio de análise microscópica, que o cimento Variolink II (cimento resinoso dual convencional – Ivoclar Vivadent) desencadeou resposta inflamatória pulpar moderada aos 7 dias, a qual persistiu até o período mais longo de avaliação (2 meses). Os autores sugeriram que esta inflamação tecidual crônica estava relacionada com a difusão de monômeros livres não reagidos, liberados do agente adesivo aplicado sobre dentina condicionada com ácido antes do uso do cimento resinoso Variolink II. Com o propósito de avaliar a possível difusão transdentinária de monômeros livres lixiviados do cimento resinoso convencional Multilink Automix (Ivoclar Vivadent), Kerezoudi et al.⁴⁰ prepararam discos de dentina humana, os quais foram acoplados a um dispositivo com pressão intra-pulpar simulada. Os autores localizaram o monômero HEMA em todos os extratos, sendo que os demais monômeros presentes na composição química do material (BPA, UDMA e BisGMA) não foram detectados. Segundo Kerezoudi et al.⁴⁰, a presença

comum de HEMA nos extratos ocorreu devido a característica hidrófila deste monômero, bem como seu menor peso molecular em comparação aos demais.

No presente estudo, independente da interposição da faceta cerâmica entre o cimento e a fonte de luz, estes materiais não apresentaram diferença estatística de citotoxicidade quando aplicados sobre o substrato dentinário hibridizado e então fotoativados. Por outro lado, apesar dos ensaios de Live/Dead, F-actina e MEV demonstrarem para o grupo RV uma leve alteração no padrão de viabilidade, adesão/espalhamento e morfologia celular, respectivamente, foi possível observar que os parâmetros quantitativos de resposta celular não diferiram estatisticamente em relação ao controle negativo. Estes resultados demonstram que a citotoxicidade dos cimentos resinosos pode estar relacionada não apenas à presença ou não da peça cerâmica, mas também da composição química e técnica de aplicação do material avaliado. Num estudo recente, Oguz et al.⁴² avaliaram a citotoxicidade de dois cimentos resinosos duais convencionais (RelyX ARC e VariolinkN) e dois auto-adesivos (RelyX Unicem e Multilink Speed) em cultura de fibroblastos (NIH/3T3). Um aparelho de LED foi usado para polimerizar os materiais, com ou sem a interposição de disco de cerâmica de dissilicato de lítio ou de resina nano-cerâmica (2 mm de espessura). Os autores também avaliaram os materiais submetidos ao processo de auto-polimerização. Para obter os extratos de cada grupo, as amostras dos cimentos resinosos foram imersas em meio de cultura pelos períodos de 0, 1, 2 e 7 dias. Para determinar a citotoxicidade dos materiais (MTT assay), os extratos foram aplicados sobre as células semeadas em placas de acrílico. Foi demonstrado que a citotoxicidade dos cimentos resinosos, a qual foi dependente de sua composição química, diminuiu gradualmente até o período de 7 dias. Os maiores valores de toxicidade foram registrados no dia 2 para cimentos resinosos convencionais e no dia 0 para cimentos auto-adesivos. A forma de auto-polimerização dos materiais resultou nos maiores valores de citotoxicidade, especialmente para o cimento Multilink Speed. A presença e o tipo de disco cerâmico usado no estudo exerceu influência sobre a citotoxicidade dos cimentos resinosos, a qual também variou de acordo com a composição química deles. Assim, os autores concluíram que diversos fatores podem interferir na adequada polimerização de materiais resinosos e que a irradiação desempenha papel importante na redução dos efeitos citotóxicos destes produtos.

Considerando os interessantes resultados da presente pesquisa, onde foi possível demonstrar que embora todos os materiais resinosos tenham causado algum dano às células MDPC-23, o efeito tóxico deles foi menor quando agentes adesivos e cimentos foram usados em associação. É importante ressaltar que, neste estudo, cada sistema adesivo foi fotoativado por 10 s, tal como recomendado por seus fabricantes. Todavia, pesquisadores têm relatado que este tempo de irradiação não é suficiente para obter uma adequada polimerização do agente adesivo, mesmo em condições laboratoriais ideais^{101,102}. Ainda seguindo as recomendações dos fabricantes, no presente estudo os cimentos resinosos aplicados sobre dentina hibridizada foram fotoativados por períodos que variaram de 20 a 40 segundos. Assim, sugere-se que o maior tempo de exposição do conjunto (sistema adesivo + cimento resinoso) à luz, tenha elevado o GC monomérica do material adesivo previamente aplicado, resultando em menor quantidade de monômeros livres e, conseqüentemente, menor citotoxicidade transdentinária. Em concordância com os presentes achados, Bianchi et al.⁶⁹ demonstraram que a fotoativação por 20 segundos aumentou significativamente o GC de todos os sistemas adesivos avaliados, em comparação com o tempo de 10 segundos. Outros estudos também demonstram que o tempo de irradiação de materiais resinosos é inversamente proporcional ao GC monomérica, o que faz com que menor quantidade de monômeros livres estejam disponíveis para se difundir pelos túbulos dentinários para causar citotoxicidade sobre células pulpares^{9,39,52,103-106}.

Neste estudo, o pH dos extratos foi avaliado ao longo de 24 horas após imersão de corpos de prova, preparados com os materiais resinosos, no meio de cultura. Este procedimento foi realizado com objetivo de determinar a possível influência do pH do ambiente gerado após aplicação dos materiais em teste, sobre a citotoxicidade deles. de Souza Costa et al.²⁷ relataram que extratos de alguns agentes adesivos com valores de pH muito baixos (próximo de 1,0) podem causar danos imediatos e irreversíveis para células pulpares. De acordo com Hirose et al.¹⁰⁷, o efeito do pH ácido extracelular pode causar redução do metabolismo e proliferação das células, ou até mesmo induzir morte celular direta. Na presente pesquisa in vitro, o valor médio do pH dos extratos obtidos dos agentes adesivos foi menor do que àquele determinado para o meio de cultura puro (MC, controle). Porém, esta discreta variação de pH observada nos extratos dos agentes adesivos não foi suficiente para causar

danos celulares significativos, o que indica que o pH dos extratos de todos os grupos permaneceu numa faixa cuja homeostase celular é mantida, tal como previamente relatado por Hirose et al.¹⁰⁷. Assim, de acordo com a metodologia usada na presente pesquisa, é possível sugerir que as alterações de pH geradas pelos materiais resinosos testados não tenham exercido influência direta na toxicidade deles sobre as células pulpares em cultura.

Dentre os agentes de cimentação investigados, AV exibiu efeito tóxico superior aos demais, principalmente quando fotoativado através da faceta cerâmica (grupo AV+FC); para esse grupo específico, foi observado redução maior do que 50% em todos os parâmetros de citotoxicidade avaliados. Os dados de toxicidade celular transdutinária se apresentaram inversamente proporcionais ao GC determinado para os grupos onde os materiais resinosos foram usados, em especial no grupo AV+FC. Uma vez que já foi demonstrado que baixos índices de GC geram maior quantidade de monômeros livres não reagidos⁹⁹ e que a citotoxicidade de materiais resinosos está diretamente relacionada ao GC^{56,108}, certamente uma maior quantidade de monômeros livres lixiviaram do cimento AV. Ainda, é importante salientar que previamente ao uso desse cimento, a dentina foi hibridizada com o sistema adesivo AU, o qual causou elevada citotoxicidade quando usado isoladamente. Portanto, é possível sugerir que esses achados sejam consequência da associação desses dois materiais resinosos.

Os cimentos resinosos VE e RV, fotoativados ou não através de uma faceta cerâmica, causaram definido efeito tóxico para as células MDPC-23. Porém, esse efeito adverso não ultrapassou 50%, considerando os protocolos laboratoriais empregados nesse estudo para determinar o nível de citotoxicidade dos produtos. Tal resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos dados de GC observados para os cimentos VE e RV, os quais foram significativamente maiores em comparação ao cimento AV. Embora o tempo de irradiação do cimento VE tenha sido de apenas 20 segundos, o GC deste produto quando fotoativado sem interposição da peça cerâmica, foi superior aos demais materiais resinosos testados. Alkhudhairy et al.¹⁰⁹ avaliaram o GC de diversos cimentos resinosos por meio de FTIR. Os autores demonstraram que o cimento VE apresentou o maior GC em comparação aos demais materiais resinosos fotoativados e demais investigados. No referido estudo, os cimentos

foram irradiados através da interposição de um disco de cerâmica com 1 mm de espessura, tal como realizado na presente investigação. Uma possível explicação para este GC superior do cimento VE seja o fato dele conter o fotoiniciador Ivocerin® na sua composição. Esse fotoiniciador atua como um impulsionador da polimerização e tem maior capacidade de fotopolimerização do que a canforoquinona devido a maior absorção de luz na faixa entre 400 e 450 nm^{110,111}. O espectro de emissão da unidade fotopolimerizadora LED usada no presente estudo (Valo, Ultradent) atua com o espectro de absorção do Ivocerin®, o que pode esclarecer o elevado GC apresentado neste estudo pelo cimento VE.

O grupo RV foi o único que não apresentou redução significativa dos parâmetros quantitativos de viabilidade celular, atividade de ALP e formação de nódulos de mineralização. Possivelmente, o elevado GC apresentado por esse cimento resinoso, associado ao menor efeito tóxico do adesivo SB, contribuiu para os resultados positivos observados no presente estudo. Os cimentos resinosos apresentam em sua composição maior quantidade de monômeros com alto peso molecular, como o Bis-GMA e UDMA, os quais aumentam consideravelmente a viscosidade dos produtos¹¹². Em decorrência da irradiação, esses monômeros conferem resistência mecânica aos cimentos resinosos por meio da formação de polímeros densamente reticulados¹¹³, sendo que a característica hidrófoba deles, faz com que estas moléculas tenham menor capacidade de difundir-se via transdentinária⁹⁹. Tal como previamente demonstrado, os cimentos resinosos por si só, exibem limitado potencial citotóxico quando uma barreira de dentina está presente entre eles e as células pulpares^{14, 26}. Portanto, sugere-se que o principal responsável pela discreta citotoxicidade e alteração morfológica celular observado no grupo RV, tenha sido a hibridização da dentina, a qual foi realizada previamente à aplicação do cimento resinoso.

Embora a interposição da faceta cerâmica entre a fonte de luz e os materiais resinosos não influenciou significativamente o efeito citotóxico observado nos grupos avaliados neste estudo, a presença da peça protética de 1mm de espessura reduziu o GC dos materiais resinosos. Durante o procedimento de cimentação, a interposição de peças cerâmicas pode atenuar o nível de irradiação e aumentar a dispersão da luz, limitando a quantidade de energia que atinge a camada

de cimento resinoso¹¹⁴. Assim, cimentos resinosos podem apresentar instabilidade de cor e propriedades mecânicas reduzidas¹¹⁵. Por essa razão, a resistência de união dos cimentos à dentina também foi avaliada neste estudo. De acordo com os valores de resistência de união obtidos em todos os grupos, foi possível determinar que os cimentos testados são estatisticamente semelhantes, independente da interposição ou não da faceta cerâmica entre eles e a fonte emissora de luz. Akgungor et al.¹¹⁶ avaliaram a resistência de união ao cisalhamento após cimentação de discos cerâmicos de dissilicato de lítio (Empress 2, Ivoclar Vivadent) com diferentes espessuras (1 mm; 1,5 mm; e 2,0 mm). O teste foi realizado após 10 minutos e 24 horas da cimentação dos discos cerâmicos, sendo que no período mais longo (24 horas), os espécimes foram submetidos à ciclagem térmica. Os discos foram cimentados à dentina com um material resinoso dual (Illusion, Bisco Inc), utilizando para isso a pasta base e catalizadora (polimerização dupla) ou apenas a pasta base (fotopolimerização). Os autores observaram que a espessura dos discos cerâmicos, modo de polimerização e período de análise, não influenciaram os valores de resistência de união, sendo determinado semelhança estatística entre todos os grupos. Sabe-se que a contínua degradação da porção resinosa e das fibrilas de colágeno ocorre por hidrólise, bem como pela ação de catepsinas, cisteínas e metaloproteinases presentes no substrato dentinário^{117,118}. Este efeito enzimático na interface adesiva, resulta na deterioração da camada híbrida e a consequente perda da resistência de união¹¹⁸⁻¹²⁰, o que pode ser acelerado de acordo com as técnicas e materiais utilizados, bem como a irradiação deficiente deles¹²¹. Na presente pesquisa, as avaliações de resistência de união ocorreram logo após a realização dos procedimentos, o que caracteriza uma limitação do estudo. Dessa forma, torna-se relevante, em futuras investigações, proceder o envelhecimento dos espécimes, o que certamente fornecerá dados científicos mais relevantes quanto as propriedades mecânicas dos materiais aplicados sobre dentina.

De acordo com as normas estabelecidas pela ISO 10993-5: 2009 (E)⁷⁰, redução da viabilidade celular maior do que 30% estabelece um determinado material dentário em teste como citotóxico. Essa importante normativa, estabelecida há mais de uma década, classifica o potencial citotóxico de materiais e técnicas dentro da seguinte escala: 0 - Nenhum (quando não há lise das células ou redução na proliferação celular); 1 - Fraco (redução não superior a 20%); 2 - Leve (redução não

superior a 50%); 3 - Moderado (redução não superior a 70%); e 4 - Severo (destruição quase completa ou completa das camadas celulares). Considerando esta escala, na presente pesquisa todos os materiais testados apresentaram algum potencial definido de citotoxicidade, com exceção do grupo RV. Apenas os grupos AU e AV+FC apresentaram efeito citotóxico moderado, sendo que os demais grupos resultaram em leve citotoxicidade.

Com o objetivo de simular condições clínicas específicas, na presente pesquisa laboratorial foram usados discos de dentina obtidos de dentes humanos, os quais foram adaptados em câmaras pulpares artificiais, sendo que a aplicação dos materiais resinosos sobre dentina seguiu estritamente as recomendações dos seus fabricantes. Células de linhagem odontoblástica foram expostas aos componentes dos materiais que se difundiram pelos túbulos dentinários para alcançar o espaço pulpar, tal como realizado previamente por diversos pesquisadores^{26,31,61,62,66,67,69,83}. Porém, apesar dos relevantes resultados obtidos com a completa execução deste estudo, já foi relatado que dados científicos obtidos de pesquisas *in vitro* não podem ser extrapolados, de imediato, para situações clínicas^{15,86}. Isso se deve ao fato de que em dentes vitais de mamíferos, existe a exsudação do fluído dentinário, o qual exerce pressão no sentido contrário ao da difusão das moléculas tóxicas lixiviadas dos materiais dentários¹²². O fluído dentinário apresenta colágeno, interglobulinas e outros componentes, os quais podem interagir com monômeros resinosos ou outras moléculas originadas dos materiais dentários, limitando também a difusão transdentinária deles¹²³. Essa influência na difusão de componentes dos materiais ainda pode ocorrer devido a presença física de prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos no interior dos túbulos dentinários^{15,86,123}. Quanto ao tecido pulpar de dentes vitais, este exibe uma complexa organização estrutural, caracterizada pela presença de células do sistema imunológico, delicada estrutura nervosa, rede ampla de vasos sanguíneos e linfáticos, células mesenquimais indiferenciadas e outros componentes que determinam a inerente capacidade de reparo e regeneração deste tecido conjuntivo especializado contra agressões e traumas de diferentes origens¹²⁴. Até o presente momento, essas características do complexo dentina-polpa ainda não foram completamente mimetizadas *in vitro*. Assim, apesar dos diversos protocolos laboratoriais executados nesta investigação permitirem determinar, de forma comparativa, os cimentos resinosos com maior potencial tóxico para células pulpares,

futuros estudos in vivo são necessários para avaliar a biocompatibilidade destes materiais dentários, o que permitirá selecionar àqueles que oferecem maior segurança de uso clínico.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia usada no presente estudo laboratorial in vitro, foi possível concluir que:

1. Apenas o cimento resinoso RelyX Veneer pode ser considerado atóxico, pois não causou redução significativa da viabilidade e adesão, bem como da atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização pelas células MDPC-23. A interposição da faceta cerâmica entre a fonte de luz e os materiais resinosos não teve influência sobre a citotoxicidade transdentinária dos produtos avaliados;
2. Os materiais resinosos irradiados através da interposição de uma faceta cerâmica de 1 mm de espessura entre eles e a fonte de luz, apresentaram grau de conversão significativamente menor do que aqueles irradiados diretamente;
3. Todos os materiais resinosos apresentaram resistência de união à dentina, cujos valores variaram de 8,2 à 12,0 MPa. A interposição de facetas cerâmicas entre a fonte de luz e os cimentos resinosos não interferiu na resistência de união imediata desses materiais dentários com a dentina.

REFERÊNCIAS*

1. Moshaverinia A. Review of the modern dental ceramic restorative materials for esthetic dentistry in the minimally invasive age. *Dent Clin North Am.* 2020; 64(4): 621-31.
2. Morimoto S, Albanesi RB, Sesma N, Agra CM, Braga MM. Main clinical outcomes of feldspathic porcelain and glass-ceramic laminate veneers: a systematic review and meta-analysis of survival and complication rates. *Int J Prosthodont.* 2016; 29(1): 38-49.
3. Bajraktarova-Valjakova E, Korunoska-Stevkovska V, Kapusevska B, Gigovski N, Bajraktarova-Misevska C, Grozdanov A. Contemporary dental ceramic materials, a review: chemical composition, physical and mechanical properties, indications for use. *Maced J Med Sci.* 2018; 6(9): 1742-55.
4. Palmeira ARB, Vieira-Junior WF, Amaral FL, Basting RT, Turssi CP, França FM. Influence of ceramic laminate on water sorption, solubility, color stability, and microhardness of resin cements. *Am J Dent.* 2019; 32(5): 229-34.
5. Schneider LFJ, Ribeiro RB, Liberato WF, Salgado VE, Moraes RR, Cavalcante LM. Curing potential and color stability of different resin-based luting materials. *Dent Mater.* 2020; 36(10): 309-15.
6. Kilinc E, Antonson SA, Hardigan PC, Kesercioglu A. Resin cement color stability and its influence on the final shade of all-ceramics. *J Dent.* 2011; 39(1): 30-6.
7. Pissaiá JF, Guanaes BKA, Kintopp CCA, Correr GM, da Cunha LF, Gonzaga CC. Color stability of ceramic veneers as a function of resin cement curing mode and shade: 3-year follow-up. *PLoS One.* 2019; 14(7): e0219183.
8. Castellanos M, Delgado AJ, Sinhoreti MAC, de Oliveira DCRS, Abdulhameed N, Geraldeli S, et al. Effect of thickness of ceramic veneers on color stability and bond strength of resin luting cements containing alternative photoinitiators. *J Adhes Dent.* 2019; 21(1): 67-76.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

9. Bragança GF, Mazão JD, Versluis A, Soares CJ. Effect of luting materials, presence of tooth preparation, and functional loading on stress distribution on ceramic laminate veneers: a finite element analysis. *J Prosth Dent.* 2021; 125(5): 778-87.

10. Daneshpooy M, Pournaghi Azar F, Alizade Oskoei P, Bahari M, Asdaghi S, Khosravani SR. Color agreement between try-in paste and resin cement: effect of thickness and regions of ultra-translucent multilayered zirconia veneers. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2019; 13(1): 61-7.

11. Scotti N, Comba A, Cadenaro M, Fontanive L, Breschi L, Monaco C, et al. Effect of lithium disilicate veneers of different thickness on the degree of conversion and microhardness of a light-curing and a dual-curing cement. *Int J Prosth.* 2016; 29(4): 384-8.

12. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010; 38(9): 687-97.

13. Cetingüç A, Olmez S, Vural N. HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. *Dent Mater.* 2007; 23(3): 302-7.

14. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater.* 2006; 22(10): 954-62.

15. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 769-84.

16. Shortall AC, Felix CJ, Watts DC. Robust spectrometer-based methods for characterizing radiant exitance of dental LED light curing units. *Dent Mater.* 2015; 31(4): 339-50.

17. Strazzi-Sahyon HB, Rocha EP, Assunção WG, Dos Santos PH. Influence of light-curing intensity on color stability and microhardness of composite resins. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2020; 40(1): 129-34.

18. Faria-e-Silva AL, Pfeifer CS. Effectiveness of high-power LEDs to polymerize resin cements through ceramics: an in vitro study. *J Prosthet Dent.* 2017; 118(5): 631-63.

19. Perroni AP, Kaizer MR, Della Bona A, Moraes RR, Boscato N. Influence of light-cured luting agents and associated factors on the color of ceramic laminate veneers: a systematic review of in vitro studies. *Dent Mater.* 2018; 34(11):1610-24.
20. Jung H, Friedl KH, Hiller KA, Haller A, Schmalz G. Curing efficiency of different polymerization methods through ceramic restorations. *Clin Oral Investig.* 2001; 5(3): 156-61.
21. Ausiello P, Cassese A, Miele C, Beguinot F, Garciagodoy F, Di Jeso B, et al. Cytotoxicity of dental resin composites: an in vitro evaluation. *J Appl Toxicol.* 2013; 33(6): 451-7.
22. Bansal R, Taneja S, Kumari M. Effect of ceramic type, thickness, and time of irradiation on degree of polymerization of dual – cure resin cement. *J Conserv Dent.* 2016; 19(5): 414-8.
23. Novais VR, Raposo LH, Miranda RR, Lopes CC, Simamoto PC Júnior, Soares CJ. Degree of conversion and bond strength of resin-cements to feldspathic ceramic using different curing modes. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(1): 61-8.
24. Giannini M, André CB, Gobbo VC, Rueggeberg FA. Accuracy of irradiance and power of light-curing units measured with handheld or laboratory grade radiometers. *Braz Dent J.* 2019; 30(4): 397-403.
25. Papazoglou E, Rahiotis C, Kakaboura A, Loukidis M. Curing efficiency of a photo- and dual-cured resin cement polymerized through 2 ceramics and a resin composite. *Int J Prosthodont.* 2006; 19(1): 34-6.
26. Garcia LFR, Pontes EC, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Transdental cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(7): 1559-66.
27. de Souza Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999; 15(6): 434-41.
28. Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci.* 2009; 10(9): 3861-99.

29. Krifka S, Seidenader C, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. *Clin Oral Invest.* 2012; 16(1): 215-24.
30. Krifka S., Spagnuolo G., Schmalz G., Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 2013; 34(19): 4555-63.
31. Pontes EC, Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Am J Dent.* 2014; 27(5): 237-44.
32. D'Alpino PHP, Moura GEDD, Barbosa SCA, Marques LA, Eberlin MN, Nascimento FD, et al. Differential cytotoxic effects on odontoblastic cells induced by self-adhesive resin cements as a function of the activation protocol. *Dent Mater.* 2017; 33(12): 1402-15.
33. Aguiar TR, Di Francescantonio M, Bedran-Russo AK, Giannini M. Inorganic composition and filler particles morphology of conventional and self-adhesive resin cements by SEM/EDX. *Microsc Res Tech.* 2012; 75(10): 1348-52.
34. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil.* 1994; 21(4): 441-52.
35. 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(8): 396-403.
36. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. *Biomaterials.* 1991; 12(8): 737-40.
37. de Souza Costa CA, do Nascimento AB, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater.* 2002; 18(7): 543-51.
38. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod.* 2005; 31(5): 396-9.

39. Ergun G, Egilmez F, Yilmaz S. Effect of reduced exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power led. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(3): 286-92.
40. Kerezoudi C, Gogos C, Samanidou V, Tziafas D, Palaghias G. Evaluation of monomer leaching from a resin cement through dentin by a novel model. *Dent Mater.* 2016; 32(11): 297-305.
41. Mahdhaoui K, Fournier B, Derbanne MA. Unbound monomers do diffuse through the dentin barrier. *Dent Mater.* 2017; 33(6): 743-51.
42. Oguz EI, Hasanreisoglu U, Uctasli S, Özcan M, Kiyan M. Effect of various polymerization protocols on the cytotoxicity of conventional and self-adhesive resin-based luting cements. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(3): 1161-70.
43. Tian T, Tsoi JK, Matinlinna JP, Burrow MF. Aspects of bonding between resin luting cements and glass ceramic materials. *Dent Mater.* 2014; 30(7): 147-62.
44. Hill EE, Lott J. A clinically focused discussion of luting materials. *Aust Dent J.* 2011; 56(1): 67-76.
45. Pegoraro TA, da Silva NR, Carvalho RM. Cements for use in esthetic dentistry. *Dent Clin North Am.* 2007; 51(2): 453-71.
46. Stewart GP, Jain P, Hodges J. Shear bond strength of resin cements to both ceramic and dentin. *J Prosthet Dent.* 2002; 88(3): 277-84.
47. Piwowarczyk A, Lauer HC, Sorensen JA. Microleakage of various cementing agents for full cast crowns. *Dent Mater.* 2005; 21(5): 445-53.
48. Strazzi-Sahyon HB, Chimanski A, Yoshimura HN, Dos Santos PH. Effect of previous photoactivation of the adhesive system on the color stability and mechanical properties of resin components in ceramic laminate veneer luting. *J Prosthet Dent.* 2018; 120(4): 631.e1-6.
49. Silva WO, Almeida RF, Leal L, Carvalho Junior EU. Recontorno estético multidisciplinar com cirurgia plástica gengival e laminados cerâmicos de dissilicato de lítio: passo a passo. *Rev Dental Press Estet.* 2015; 12(4):101-18.

50. Soares PV, Zeola LF, Souza PG, Pereira FA, Milito GA, Machado AC. Reabilitação estética do sorriso com facetas cerâmicas reforçadas por dissilicato de lítio. *Rev Odontol Bras Central*. 2012; 21(58): 538-43.
51. Cadenaro M, Maravic T, Comba A, Mazzoni A, Fanfoni L, Hilton T, et al. The role of polymerization in adhesive dentistry. *Dent Mater*. 2019; 35(1): 1-22.
52. Archegas LR, de Menezes Caldas DB, Rached RN, Soares P, Souza EM. Effect of ceramic veneer opacity and exposure time on the polymerization efficiency of resin cements. *Oper Dent*. 2012; 37(3): 281-9.
53. Pacheco RR, Carvalho AO, André CB, Ayres APA, de Sá RBC, Dias TM, et al. Effect of indirect restorative material and thickness on light transmission at different wavelengths. *J Prosthodont Res*. 2019; 63(2): 232-8.
54. Yan YL, Kim YK, Kim KH, Kwon TY. Changes in degree of conversion and microhardness of dental resin cements. *Oper Dent*. 2010; 35(2): 203-10.
55. Runnacles P, Correr GM, Baratto Filho F, Gonzaga CC, Furuse AY. Degree of conversion of a resin cement light-cured through ceramic veneers of different thicknesses and types. *Braz Dent J*. 2014; 25(1): 38-42.
56. Morgan LF, Teixeira KI, Vasconcellos WA, Albuquerque RC, Cortés ME. Correlation between the cytotoxicity of self-etching resin cements and the degree of conversion. *Indian J Dent Res*. 2015; 26(3): 284-8.
57. Hardy CMF, Bebelman S, Leloup G, Hadis MA, Palin WM, Leprince JG. Investigating the limits of resin-based luting composite photopolymerization through various thicknesses of indirect restorative materials. *Dent Mater*. 2018; 34(9): 1278-88.
58. Rizzante FAP, Locatelli PM, Porto TS, Borges AFS, Mondelli RFL, Ishikiriama SK. Physico-mechanical properties of resin cement light cured through different ceramic spacers. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018; (85): 170-4.
59. Drumond AC, Paloco EA, Berger SB, González AH, Carreira AJ, D'Alpino PH, et al. Effect of two processing techniques used to manufacture lithium disilicate ceramics on the degree of conversion and microshear bond strength of resin cement. *Acta Odontol Latinoam*. 2020; 33(2):98.

60. Yamaguchi S, Nath S, Sugawara Y, Divakarla K, Das T, Manos J, et al. Two-in-one biointerfaces-antimicrobial and bioactive nanoporous gallium titanate layers for titanium implants. *Nanomaterials (Basel)*. 2017; 7(8): 229.

61. Leite MLAS, de Souza Costa CA, Duarte RM, Andrade AKM, Soares DG. Bond strength and cytotoxicity of a universal adhesive according to the hybridization strategies to dentin. *Braz Dent J*. 2018; 29(1): 68-75.

62. Soares DG, Brito CA, Tavares da Silva RH, Ribeiro AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytocompatibility of HEMA-free resin-based luting cements according to application protocols on dentine surfaces. *Int Endod J*. 2016; 49(6): 551-60.

63. Goracci C, Cury AH, Cantoro A, Papacchini F, Tay FR, Ferrari M. Microtensile bond strength and interfacial properties of self-etching and self-adhesive resin cements used to lute composite onlays under different seating forces. *J Adhes Dent*. 2006; 8(5): 327-35.

64. Mendes Soares IP, Anovazzi G, Anselmi C, Leite ML, Scheffel DLS, Soares DG, et al. Response of pulp cells to resin infiltration of enamel white spot-like lesions. *Dent Mater*. 2021; 37(6): 329-40.

65. Soares DG, Anovazzi G, Bordini EAF, Zuta UO, Silva Leite MLA, Basso FG, et al. Biological analysis of simvastatin-releasing chitosan scaffold as a cell-free System for pulp-dentin regeneration. *J Endod*. 2018; 44(6): 971-6.

66. Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 104(4): 102-8.

67. Souza IR, Pansani TN, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytotoxicity of acrylic resin-based materials used to fabricate interim crowns. *J Prosthet Dent*. 2020; 124(1): 122.e1-9.

68. Bueno AL, Arrais CA, Jorge AC, Reis AF, Amaral CM. Light-activation through indirect ceramic restorations: does the overexposure compensate for the attenuation in light intensity during resin cement polymerization? *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(1): 22-7.

69. Bianchi L, Ribeiro AP, de Oliveira Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Transdental cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dent Mater*. 2013; 29(9): 980-90.
70. International Standard Organization. ISO 10993-5:2009 (E). Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. 3th ed. Geneva: International Standard Organization; 2009.
71. Lopes CCA, Rodrigues RB, Silva AL, Simamoto Júnior PC, Soares CJ, Novais VR. Degree of conversion and mechanical properties of resin cements cured through different all-ceramic systems. *Braz Dent J*. 2015; 26(5): 484-9.
72. Noda Y, Nakajima M, Takahashi M, Mamanee T, Hosaka K, Takagaki T, et al. The effect of five kinds of surface treatment agents on the bond strength to various ceramics with thermocycle aging. *Dent Mater J*. 2017; 36(6): 755-61.
73. Albuquerque PPAC, Duarte MFB, Moreno MBP, Schneider LFJ, Moraes RR, Cesar PF, et al. Physicochemical properties and microshear bond strength of experimental self-adhesive resin cements to dentin or yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal. *J Adhes Dent*. 2019; 21(2): 133-41.
74. The Academy of Prosthodontics. The glossary of prosthodontic terms. *J Prosthet Dent*. 2005; 94(1): 21-38.
75. Edelhoff D, Özcan M. To what extent does the longevity of fixed dental prostheses depend on the function of the cement? Working Group 4 materials: cementation. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(3): 193-204.
76. Almeida JR, Schmitt GU, Kaizer MR, Boscato N, Moraes RR. Resin-based luting agents and color stability of bonded ceramic veneers. *J Prosthet Dent*. 2015; 114(2): 272-7.
77. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(6): 1367-73.
78. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res*. 2013; 92(9): 765-72.

79. Hebling J, Ribeiro APD, de Souza Costa CA. Relação entre materiais dentários e o complexo dentino-pulpar. *Rev Odontol Bras Central*. 2010; 18(48): 1-9.
80. Nakabayashi N. The hybrid layer: a resin-dentin composite. *Proc Finn Dent Soc*. 1992; 88(1): 321-9.
81. Pashley DH. Dynamics of the pulpodentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996; 7(2): 104-33.
82. de Oliveira Duque CC, Soares DG, Briso A, Ortecho-Zuta U, de Oliveira Ribeiro RA, Hebling J, et al. Influence of tooth pigmentation on H₂O₂ diffusion and its cytotoxicity after in-office tooth bleaching. *Oper Dent*. 2020; 45(6): 632-42.
83. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alecio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*. 2009; 25(6): 533-43.
84. Jiang RD, Lin H, Zheng G, Zhang XM, Du Q, Yang M. In vitro dentin barrier cytotoxicity testing of some dental restorative materials. *J Dent*. 2017; 58: 28-33.
85. Pahlevan A, Mirzaee M, Yassine E, Ranjbar Omrany L, Hasani Tabatabaee M, Kermanshah H, et al. Enamel thickness after preparation of tooth for porcelain laminate. *J Dent*. 2014; 11(4): 428-32.
86. de Souza Costa CA. Biological aspects of dental materials. *J Ashes Dent*. 2020; 22(5): 540-4.
87. de Souza G, Braga RR, Cesar PF, Lopes GC. Correlation between clinical performance and degree of conversion of resin cements: a literature review. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(4): 358-68.
88. Rothmund L, Shehata M, Van Landuyt KL, Schweikl H, Carell T, Geurtsen W, et al. Release and protein binding of components from resin based composites in native saliva and other extraction media. *Dent Mater*. 2015 ;31(5): 496-504.
89. Putzeys E, Nys S, Cokic SM, Duca RC, Vanoirbeek J, Godderis L, et al. Long-term elution of monomers from resin-based dental composites. *Dent Mater*. 2019; 35(3): 477-85.

90. Shehata M, Durner J, Eldenez A, Van Landuyt KL, Styllou P, Rothmund L, et al. Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2013; 29: 971-9.
91. Schweikl H, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Buchalla W, Krifka S. 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM- and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. *Biomaterials*. 2014; 35(9): 2890-904.
92. Bølling AK, Samuelsen JT, Morisbak E, Ansteinsson V, Becher R, Dahl JE, et al. Dental monomers inhibit LPS-induced cytokine release from the macrophage cell line RAW264.7. *Toxicol Lett*. 2013; 216(2-3): 130-8.
93. Galler K, Schweikl H, Hiller KA, Cavender A, Bolay C, D'Souza R, et al. TEGDMA reduces the expression of genes involved in biomineralization. *J Dent Res*. 2011; 90(2): 257-62.
94. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Effects of HEMA and TEDGMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dent Mater*. 2011; 27(6): 608-17.
95. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Effects of resinous monomers on the odontogenic differentiation and mineralization potential of highly proliferative and clonogenic cultured apical papilla stem cells. *Dent Mater* 2012; 28(3): 327-39.
96. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011; 27(1): 1-16.
97. Nasser EB, Eskandarizadeh A. Comparative study of different cytotoxicity of bonding systems with different dentin thickness on L929 cell line: an experimental study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2020; 17(6): 424-32.
98. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007; 28(26): 3757-85.

99. Putzeys E, Duca RC, Coppens L, Vanoirbeek J, Godderis L, Van Meerbeek B, et al. In-vitro transdermal diffusion of monomers from adhesives. *J Dent*. 2018; 75: 91-7.
100. Baldion PA, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Dental resin monomers induce early and potent oxidative damage on human odontoblast-like cells. *Chem Biol Interact*. 2021; 333: 109336.
101. Breschi L, Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Biasotto M, Prati C, et al. Polymerization kinetics of dental adhesives cured with LED: correlation between extent of conversion and permeability. *Dent Mater*. 2007; 23: 1066-72.
102. Leprince JG, Palin WM, Hadis MA, Devaux J, Leloup G. Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency. *Dent Mater*. 2013; 29(2): 139-56.
103. Arrais CA, Pontes FM, Santos LP, Leite ER, Giannini M. Degree of conversion of adhesive systems light-cured by LED and halogen light. *Braz Dent J*. 2007; 18(1): 54-9.
104. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *J Dent*. 2012; 40(12): 1090-102.
105. Lanza MDS, Andreeta MRB, Pegoraro TA, Pegoraro LF, Carvalho RM. Influence of curing protocol and ceramic composition on the degree of conversion of resin cement. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(6): 700-7.
106. Shim JS, Han SH, Jha N, Hwang ST, Ahn W, Lee JY, et al. Effect of irradiance and exposure duration on temperature and degree of conversion of dual-cure resin cement for ceramic restorations. *Oper Dent*. 2018; 43(6): 280-7.
107. Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M, Gotoh M, et al. Effects of extracellular pH on dental pulp cells in vitro. *J Endod*. 2006; 42(5): 735-41.
108. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Lussi A, Gruber R, Ilie N, Price RB, et al. Effect of the degree of conversion of resin-based composites on cytotoxicity, cell attachment, and gene expression. *Dent Mater*. 2019; 35(8): 1173-93.

109. Alkhudhairy F, AlKheraif A, Naseem M, Khan R, Vohra F. Degree of conversion and depth of cure of Ivocerin containing photo-polymerized resin luting cement in comparison to conventional luting agents. *Pak J Med Sci*. 2018; 34(2): 253-9.
110. Ilie N, Stark K. Curing behaviour of high-viscosity bulk-fill composites. *J Dent*. 2014; 42(8): 977-85.
111. Yap AU, Pandya M, Toh WS. Depth of cure of contemporary bulk-fill resin-based composites. *Dent Mater J*. 2016; 35(3): 503-10.
112. Habib E, Wang R, Zhu XX. Correlation of resin viscosity and monomer conversion to filler particle size in dental composites. *Dent Mater*. 2018; 34(10): 1501-8.
113. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* 2002; 23(8): 1819-29.
114. Blumentritt FB, Cancian G, Saporiti JM, de Holanda TA, Barbon FJ, Boscato N. Influence of feldspar ceramic thickness on the properties of resin cements and restorative set. *Eur J Oral Sci*. 2021; 129(2): e12765.
115. Tafur-Zelada CM, Carvalho O, Silva FS, Henriques B, Özcan M, Souza JCM. The influence of zirconia veneer thickness on the degree of conversion of resin-matrix cements: an integrative review. *Clin Oral Investig*. 2021; 25(6): 3395-408.
116. Akgungor G, Akkayan B, Gaucher H. Influence of ceramic thickness and polymerization mode of a resin luting agent on early bond strength and durability with a lithium disilicate-based ceramic system. *J Prosthet Dent*. 2005; 94(3): 234-41.
117. Alonso JRL, Basso FG, Scheffel DLS, de-Souza-Costa CA, Hebling J. Effect of crosslinkers on bond strength stability of fiber posts to root canal dentin and in situ proteolytic activity. *J Prosthet Dent*. 2018; 119(3): 494.e1-9.
118. Scheffel DLS, Cury JA, Tenuta LMA, Scheffel RH, Perez C, Soares DG, et al. Proteolytic activity, degradation, and dissolution of primary and permanent teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2020; 30(5): 650-9.

119. Oyagüe RC, Monticelli F, Toledano M, Osorio E, Ferrari M, Osorio R. Effect of water aging on microtensile bond strength of dual-cured resin cements to pre-treated sintered zirconium-oxide ceramics. *Dent Mater.* 2009; 25(3): 392-9.
120. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013; 29(1): 116-35.
121. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability: a literature review. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 41-53.
122. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, et al. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res.* 2004; 83(11): 843-8.
123. Tjäderhane L, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition—an overview. *Endod Top.* 2012; 20(1): 3-29.
124. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith AJ. Dentin–pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Adv Dent Res.* 2011; 23 (3):340-5.

ANEXO

Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano

	UNESP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CAMPUS ARARAQUARA			
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP				
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA				
Título da Pesquisa: GRAU DE CONVERSÃO, RESISTÊNCIA DE UNIÃO E CITOTOXICIDADE TRANSDENTINÁRIA DE CIMENTOS RESINOSOS FOTOATIVADOS				
Pesquisador: Carlos Alberto de Souza Costa				
Área Temática:				
Versão: 4				
CAAE: 14896319.2.0000.5416				
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP				
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio				
DADOS DO PARECER				
Número do Parecer: 3.598.728				
	UNESP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA - CAMPUS ARARAQUARA			
Continuação do Parecer: 3.598.728				
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	15:46:15	Souza Costa	Aceito
Situação do Parecer: Aprovado				
Necessita Apreciação da CONEP: Não				
ARARAQUARA, 25 de Setembro de 2019 _____ Assinado por: Andréa Gonçalves (Coordenador(a))				

Não autorizo a publicação deste trabalho até 11 de agosto de 2023

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 11 de agosto de 2021

Fernanda Ali Kitagawa