



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

**Efeito do Adper™ Scotchbond™ 1 XT,
Clearfil™ SE Bond 2 e Scotchbond™ Universal
na atividade de células tipo odontoblasto**

Miguel Ângelo Almeida Cardoso

Orientadora: Doutora Ana Sofia Estima da Cunha Coelho

Coorientadora: Doutora Mafalda Sofia Laranjo Cândido

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Coimbra 2020

O trabalho de investigação descrito nesta dissertação foi realizado no:

- Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra;
- Instituto de Clínica Integrada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

A presente dissertação foi redigida segundo as normas disponibilizadas na plataforma online da FMUC – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, com o título: “NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DO TRABALHO FINAL COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DOS CICLOS DE ESTUDOS INTEGRADOS EM MEDICINA E MEDICINA DENTÁRIA”, para o ano letivo 2019/2020.

Índice

Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução	15
2. Materiais e Métodos	18
3. Resultados	25
4. Discussão	36
5. Conclusão	41
6. Agradecimentos	42
7. Referências bibliográficas	43
8. Abreviaturas, símbolos e fórmulas	47

Efeito do Adper™ Scotchbond™ 1 XT, Clearfil™ SE Bond 2 e Scotchbond™ Universal na atividade de células tipo odontoblasto

Miguel Ângelo Almeida Cardoso^{1,2,3,4}, Mafalda Sofia Laranjo Cândido^{2,4,5,6}, Carlos Miguel Machado Marto^{2,3,4,5,6}, Ana Cristina Pereira Gonçalves^{4,7,8,9}, Eduardo Leitão Costa^{3,10,11}, Anabela Baptista Pereira Paula^{1,2,4,5,6}, Eunice Virgínea Valdez Faria Bidarra Palmeirão Carrilho^{1,2,4,5,6}, Maria Filomena Rabaça Roque Botelho^{2,4,5,6}, Ana Sofia Estima da Cunha Coelho^{1,2,4,5,6}

¹Universidade de Coimbra, Instituto de Clínica Integrada, Faculdade de Medicina

²Universidade de Coimbra, Instituto de Biofísica, Faculdade de Medicina

³Universidade de Coimbra, Instituto de Patologia Experimental, Faculdade de Medicina

⁴Universidade de Coimbra, Instituto de Investigação Clínica e Biomédica (iCBR), Faculdade de Medicina

⁵Universidade de Coimbra, Área de Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina

⁶Universidade de Coimbra, CNC.IBILI

⁷Universidade de Coimbra, Centro de Inovação em Biomedicina e Biotecnologia

⁸Centro Clínico e Académico de Coimbra

⁹Universidade de Coimbra, Laboratório de Oncobiologia e Hematologia e Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de Medicina

¹⁰Universidade de Coimbra, Laboratório de Farmacologia e Cuidados Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia

¹¹Universidade de Lisboa, iMed.Ulisboa, Faculdade de Farmácia

Área da Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas 3000-075 Coimbra
Portugal

Tel.: +351 239 484 183

Fax.: +351 239 402 910

E-mail: miguel.cardoso16@gmail.com

Resumo

Introdução: Com vista à simplificação dos procedimentos operatórios, as formulações adesivas têm-se tornado cada vez mais complexas e, dado o maior rigor inerente à investigação e ao fabrico destes materiais, têm sido identificados e estudados diversos compostos indutores de reações biológicas adversas.

Objetivo: Com este estudo pretendeu-se avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos representativos das três estratégias adesivas comercialmente disponíveis - condicionar e lavar, autocondicionante e universal.

Materiais e Métodos: Obtiveram-se extratos dos adesivos Adper™ Scotchbond™ 1 XT, Clearfil™ SE Bond 2 e Scotchbond™ Universal em meio de cultura DMEM, com os quais se incubaram células odontoblásticas da linha MDPC-23. Avaliou-se a atividade metabólica através do ensaio do MTT, a viabilidade celular pelo ensaio da SRB, as vias de morte e o ciclo celular por citometria de fluxo, a morfologia celular através da coloração das células com o meio *May-Grunwald Giemsa* e a reatividade dos extratos.

Resultados: Os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT, Clearfil™ SE Bond 2 e Scotchbond™ Universal determinaram a redução significativa do metabolismo e da viabilidade celular. Após incubação das culturas com os extratos, todos os adesivos determinaram a redução do número de células vivas, com aumento do número de células em apoptose, apoptose tardia/necrose e necrose, assim como uma diminuição do número de células em fase S e em G2/M e um aumento do número de células em fase Pré-G0 e em G0/G1. Estas alterações ocorreram em função do adesivo, da concentração e do tempo de incubação. Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 foram classificados com um maior grau de reatividade, determinando uma maior inibição do crescimento celular, com destruição das camadas celulares.

Discussão: Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram uma redução mais acentuada do metabolismo e da viabilidade celulares e revelaram-se mais reativos, nas diferentes concentrações estudadas. Os extratos condicionaram a viabilidade e propagação das culturas celulares, podendo, clinicamente, interferir com importantes processos fisiológicos de reparação. Clinicamente, o condicionamento da dentina com ácido ortofosfórico favorece a progressão do adesivo nos túbulos dentinários. A incorporação da *smear layer* pelos adesivos autocondicionantes e universais (aplicados sobre dentina não condicionada) constitui uma barreira adicional à infiltração do adesivo, reduzindo a proximidade com a polpa dentária e, assim, a citotoxicidade.

Conclusões: A citotoxicidade dos adesivos revelou ser diretamente proporcional à concentração dos extratos e ao tempo de incubação. Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram uma maior citotoxicidade, nas condições estudadas.

Palavras-chave: Adesivos Dentários, Sistemas Adesivos, Citotoxicidade, Odontoblastos, Cultura Celular

Abstract

Introduction: To simplify the clinical procedures, dental adhesives are becoming more complex and, given the ascending needed accuracy, several compounds that induce biological adverse reactions have been identified and studied.

Objective: *In vitro* cytotoxicity assessment of adhesive systems of the three commercially available adhesive strategies - total-etch, self-etch and universal.

Materials and Methods: Adper™ Scotchbond™ 1 XT, Clearfil™ SE Bond 2 and Scotchbond™ Universal extracts were acquired in cell culture medium DMEM and incubated with the odontoblastic cells MDPC-23. Metabolic activity was assessed through the MTT assay, cellular viability with the SRB assay, cell's death pathways and cell's cellular cycle by flow cytometry, cell morphology and the reactivity classification of extracts through the *May-Grunwald Giemsa* staining.

Results: The Adper™ Scotchbond™ 1 XT, Clearfil™ SE Bond 2 and Scotchbond™ Universal extracts determined a significant reduction in metabolism and cell viability. After incubation of the cultures with the extracts, the adhesives determined a reduction in the number of viable cells and an increase in the number of apoptotic, late apoptosis/necrosis and necrotic cells, as well as a decrease in the number of cells in S and G2/M phases and an increase in the number of cells in Pre-G0 and G0/G1 phases. These changes were dependent on the adhesive, the concentration and the time of incubation. Clearfil™ SE Bond 2 extracts were classified as having a higher degree of reactivity, leading to greater inhibition of cell growth, with destruction of the cell's layers.

Discussion: Clearfil™ SE Bond 2 extracts determined the most significant reduction in cell metabolism and viability and proved to be more reactive at the different concentrations. The extracts reduced the viability and proliferation of the cells and, clinically, this may interfere with normal physiological processes of reparative dentinogenesis. Clinically, the acid-etched dentin with phosphoric acid may favor the diffusion of the adhesives through the dentinal tubules. On the other hand, the incorporation of the smear layer by the self-etch and universal adhesives (applied over non-etched dentin) stands as an additional barrier towards adhesive diffusion, reducing pulp proximity and thus, cytotoxicity.

Conclusions: The cytotoxicity of the adhesives proved to be directly proportional to the concentration of the extracts and to the incubation time. Clearfil™ SE Bond 2 extracts were the most cytotoxic.

Keywords: Dental Adhesives, Adhesive Systems, Cytotoxicity, Odontoblasts, Cell Culture

1. Introdução

Em medicina dentária restauradora contemporânea, os sistemas adesivos permitem a adesão dos materiais de restauração ao substrato dentário. Assim, os adesivos dentários permitem o restabelecimento da estética e função dentárias após perda de estrutura por lesão de cárie ou fratura, alterações de cor, malformações ou mau posicionamento.^(1, 2)

Atualmente, os sistemas adesivos podem ser classificados, em função da aplicação clínica, em adesivo condicionar e lavar, autocondicionante ou universal, referidos na literatura anglo-saxónica como *etch-and-rinse*, *self-etch* e *multi-mode/universal*, respetivamente. Os adesivos condicionar e lavar requerem a exposição do substrato dentário a ácido ortofosfórico, previamente à aplicação do *primer* e do *bond*. Os adesivos autocondicionantes, através da incorporação de monómeros ácidos, possuem capacidade intrínseca de interação com o substrato e, assim, podem ser aplicados sobre substrato dentário sem o condicionamento prévio com o ácido ortofosfórico. Esta modalidade permite a integração da *smear layer* criada após a preparação mecânica dos tecidos duros do dente e uma maior preservação das fibras colagénicas dentinárias. Os sistemas universais permitem a aplicação do adesivo sobre substratos condicionados ou não com ácido.^(1, 3, 4)
















Tal como estabelecido na literatura científica, os protocolos de adesão devem ser adequados ao substrato dentário. Assim, na adesão ao esmalte podem ser utilizados adesivos das três estratégias disponíveis, desde que aplicados sobre esmalte previamente condicionado por ácido ortofosfórico a 37%. Na adesão à dentina devem ser utilizados adesivos com vista à integração da *smear layer*, isto é, adesivos autocondicionantes ou universais, sem a realização do condicionamento com ácido. Em cavidades com a presença dos dois tecidos duros, esmalte e dentina, deve ser utilizado um sistema adesivo autocondicionante ou universal, com condicionamento ácido seletivo do esmalte. Os protocolos de adesão recomendados e as variações possíveis em função da apresentação do adesivo encontram-se descritos na Tabela 1.^(1, 4)

À semelhança com o que acontece com a maioria dos biomateriais em biomedicina, as casas comerciais que disponibilizam os sistemas adesivos utilizados em medicina dentária introduzem, frequentemente, produtos novos e otimizados no mercado.^(5, 6) Esta evolução ocorre no sentido de simplificar a aplicação clínica dos sistemas adesivos e de melhorar o seu desempenho, com aumento da longevidade das restaurações realizadas.⁽⁷⁻⁹⁾

Em consequência do aumento da complexidade das formulações adesivas, bem como do maior rigor associado ao fabrico dos biomateriais, têm sido identificadas e estudadas

diversas substâncias indutoras de reações biológicas adversas que estão presentes nestes produtos.^(3, 10)

Tabela 1. Estratégia adesiva, apresentação e passos clínicos de aplicação dos sistemas adesivos.

Estratégia adesiva	Apresentação	Passos clínicos		
		Ácido	Primer	Bond
Condicionar e lavar	3 passos			
	2 passos			
Autocondicionante	2* passos			
	1* passo			
Universal	1* passo			

*: condicionamento ácido seletivo ao esmalte

A capacidade de interação do sistema adesivo com o complexo dentino-pulpar é amplificada pelo prévio condicionamento ácido da dentina, uma vez que este resulta na exposição dos túbulos dentinários, facilitando a difusão do adesivo.^(11, 12) Os sistemas adesivos poderão apresentar propriedades citotóxicas devido, por exemplo, à polimerização incompleta, o que resulta numa elevada concentração de compostos livres, ou à difusão de alguns dos seus constituintes, através dos túbulos dentinários.^(12, 13)

Os sistemas adesivos que não requerem condicionamento ácido da dentina incorporam a *smear layer* na interface adesiva.^(2, 4, 14) Dada a não abertura dos túbulos dentinários, estes sistemas adesivos apresentam uma penetração menor na dentina do que a que acontece quando é utilizado ácido ortofosfórico (responsável pela remoção da *smear layer*). A utilização destes sistemas adesivos na dentina está, ainda, associada a uma menor probabilidade de ocorrência de reações adversas no complexo dentino-pulpar.^(15, 16)

Em cavidades dentinárias muito profundas, e independentemente da estratégia adesiva utilizada, os componentes citotóxicos presentes nos sistemas adesivos podem difundir-se através dos túbulos dentinários e alcançar a polpa dentária.^(12, 15) A realização de uma proteção pulpar indireta reduz a capacidade de o sistema adesivo alcançar a polpa, através da interposição de um biomaterial entre a cavidade justapulpar e a interface adesiva. A aplicação de biomateriais de proteção pulpar indireta ou de bases cavitárias está, todavia, associada a uma redução da área de adesão à dentina, o que compromete a adesão.^(17, 18)

Vários estudos publicados avaliaram a citotoxicidade de sistemas adesivos.^(5, 15, 19-21) No entanto, estes estudos avaliam, frequentemente, adesivos de uma só estratégia adesiva e com poucos testes realizados ou utilizam, na maioria, linhas de fibroblastos ou de células extraorais. Existem, ainda, diversos protocolos utilizados e publicados. Assim, é necessário avaliar adesivos das três estratégias adesivas em simultâneo, para permitir uma comparação mais robusta dos resultados, e com base em modelos experimentais reprodutíveis e com maior relevância biológica.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma avaliação da citotoxicidade, *in vitro*, de sistemas adesivos representativos das três estratégias adesivas comercialmente disponíveis (condicionar e lavar, autocondicionante e universal) mediante a exposição de culturas celulares de células tipo odontoblastos a meio de cultura condicionado pelos materiais.

2. Materiais e Métodos

Em todos os estudos, as culturas celulares foram incubadas de acordo com as recomendações da norma ISO 10993-5 (*International Standard of Biological Evaluation of Medical Devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity*)⁽²²⁾, que estabelece os procedimentos adequados para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* de dispositivos médicos.

2.1. Sistemas adesivos

Neste estudo foram utilizados três adesivos: Adper™ Scotchbond™ 1 XT (3M ESPE, EUA), Clearfil™ SE Bond 2 (Kuraray Noritake Dental Inc., Japão) e Scotchbond™ Universal (3M Deutschland GmbH, Alemanha). A estratégia adesiva, o lote de referência e a forma de apresentação dos adesivos utilizados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Sistemas adesivos utilizados, estratégia adesiva, lote e forma de apresentação.

Sistema adesivo	Estratégia adesiva	Lote	Apresentação
Adper™ Scotchbond™ 1 XT	Condicionar e lavar	N952010	Monofrasco
Clearfil™ SE Bond 2	Autocondicionante	AS0037	Dois frascos (<i>primer + bond</i>)
Scotchbond™ Universal	Universal	80514A	Monofrasco

Todos os procedimentos necessários para o estabelecimento e a manutenção das culturas foram realizados numa câmara de fluxo laminar (Holten LaminAir HBB 2448, Holten, Dinamarca), de acordo com a técnica asséptica para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura.^(23, 24)

Os sistemas adesivos foram colocados em moldes de placas de policloreto de polivinila (PVC, do inglês *Polyvinyl Chloride*), com 4 mm de diâmetro, num volume total de 10 µl, e polimerizados durante 20s com o fotopolimerizador Bluephase® Style (Ivoclar Vivadent, Principado do Listenstaine), até obtenção de um substrato sólido (*pellets*). No caso do Clearfil™ SE Bond 2, o conteúdo de cada um dos frascos foi adicionado em igual proporção. Concluída a preparação dos *pellets*, estes foram removidos dos moldes.

De acordo com protocolos já publicados^(20, 25), os *pellets* foram incubados com meio de cultura de células *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, 13,4g/l - D-5648, Sigma

Aldrich, EUA), com pH 7,4, previamente suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, F7524, Sigma Aldrich, EUA), 3,7g/l de bicarbonato de sódio (S-5761, Sigma Aldrich, EUA), 250 µM de piruvato de sódio (11360 Gibco™, Thermo Fisher Scientific, EUA) e 1% de solução de antibiótico e de antifúngico (10000 U/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina B, A5955, Sigma Aldrich, EUA). Os extratos dos adesivos foram preparados em tubos de *falcon* (Sarstedt 62.554.502, Alemanha), com a relação de um *pellet* por mL de extrato pretendido, durante 24 horas e em agitação, na incubadora HeraCell® 150 (Thermo Electron Corporation, EUA), com humidade relativa de 95%, 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 5 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido e realizaram-se as diluições pretendidas em meio de cultura DMEM.

Para os ensaios de atividade metabólica testaram-se as concentrações de 6,25%, de 12,5%, de 25%, de 50% e de 100%. Para os restantes ensaios testaram-se as concentrações de 25% e de 50%. Foram estabelecidos controlos para todos os ensaios, que corresponderam a culturas expostas apenas ao meio de cultura DMEM.

2.2. Culturas celulares

No presente trabalho foi utilizada uma linha celular de rato tipo odontoblastos – MDPC-23 (gentilmente cedida pelo Dr. Jacques E. Nör, Universidade de Michigan, EUA), sendo esta uma linha celular de utilização recomendada na avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de materiais dentários.^(25, 26) As células foram descongeladas e propagadas em cultura aderente, em frascos de 75 cm² (Sarstedt 83.3911.002, Alemanha), tendo sido mantidas, em todas as fases do estudo, na incubadora.

Para a realização dos diversos ensaios, as células foram distribuídas em placas de cultura. Para tal, após observação e avaliação da morfologia e densidade celulares ao microscópio ótico invertido (ECLIPSE TS100, Nikon, Holanda), o meio de cultura foi removido e procedeu-se à lavagem com 5 mL de solução tampão salina de fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*, constituída por 137 mM de cloreto de sódio [NaCl, S7653, Sigma Aldrich, EUA], 2,7 mM de cloreto de potássio [KCl, P9333, Sigma Aldrich, EUA], 10 mM de dihidrogenofosfato de sódio [NaH₂PO₄, S5011, Sigma Aldrich, EUA] e 1,8 mM de dihidrogenofosfato de potássio [KH₂PO₄, P06662, Sigma Aldrich, EUA], com pH de 7,4). De forma a destacar as células, adicionou-se um volume de 2 mL de uma solução de TrypLE™ Express Enzyme (12605028, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, EUA) e incubou-se durante dois minutos, a 37°C. Em seguida, o frasco foi observado ao microscópio ótico, para confirmar

o destacamento celular, e adicionou-se um volume de 5 mL de meio de cultura DMEM, de forma a inativar a reação. A suspensão celular obtida foi transferida para um falcon.

Procedeu-se à contagem do número de células de uma alíquota corada com azul de tripano a 0,4% (T8154, Sigma Aldrich, EUA), com recurso a uma câmara de Neubauer, no microscópio ótico invertido, com ampliação de 100x. O volume da suspensão celular foi ajustado com recurso ao meio de cultura DMEM, de forma a obter a concentração pretendida para cada ensaio.

2.3. Estudos de citotoxicidade

Prepararam-se suspensões com 50.000 células/mL, que foram distribuídas por placas de 48 poços (Sarstedt 83.3923, Alemanha), para o ensaio da sulforrodamina B (SRB), ou de 96 poços (Sarstedt 83.3924, Alemanha) para ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), e incubadas durante 24 horas, para permitir a adesão das células.

Após este período, substituiu-se o meio de cultura DMEM por igual volume de extrato de cada sistema adesivo, nas concentrações previamente preparadas. Os poços circundantes foram preenchidos com DMEM, de forma a garantir condições de humidade semelhantes entre os poços teste. As culturas celulares foram incubadas durante 2, 24 e 96 horas, para o ensaio do MTT, e durante 24 horas, para o ensaio da SRB.

2.3.1. Atividade metabólica

Para avaliação do efeito dos biomateriais na atividade metabólica das células realizou-se o ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Após os respetivos períodos de incubação, o meio de cultura foi aspirado e procedeu-se à lavagem dos poços com PBS. Em seguida, adicionou-se um volume de 100 µL de uma solução de MTT (M2128, Sigma Aldrich, EUA) com a concentração de 0,5 mg/mL em PBS e pH de 7,4. As placas foram incubadas no escuro, a 37°C, durante a noite. De forma a permitir a solubilização dos cristais de formazano, obtidos pela reação ocorrida, foi adicionado, a cada poço, um volume de 100 µL de uma solução de 0,04 M de ácido clorídrico (84415, Sigma Aldrich, EUA) em isopropanol (563935, Sigma Aldrich, EUA). De forma a favorecer a solubilização, as placas foram colocadas em agitação durante 45 minutos. Os poços foram individualmente homogeneizados e a absorvância foi quantificada através de um laser com o comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm, utilizando o

espectrofotómetro EnSpire® (PerkinElmer Inc., EUA). Os resultados foram apresentados como percentagem de atividade metabólica das culturas teste em relação à atividade metabólica dos controlos correspondentes.

2.3.2. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio da sulforrodamina B (SRB).

Após o período de incubação de 24 horas com os extratos, o meio de cultura foi aspirado e procedeu-se à lavagem dos poços com PBS. Após secagem, adicionou-se um volume de 50 µL de ácido acético (ARK2183, Sigma Aldrich, EUA) na concentração de 1% em metanol (322415, Sigma Aldrich, EUA) a cada poço. As placas foram incubadas durante 1 hora, a 4°C, de forma a permitir a fixação das células. Posteriormente, a solução foi removida e as placas secaram à temperatura ambiente. Adicionou-se um volume de 50 µL de uma solução de SRB na concentração de 4% (S9012, Sigma Aldrich, EUA) em ácido acético a 1% e as placas foram mantidas, durante 2 horas, à temperatura ambiente e no escuro. Findo este período, as placas foram lavadas com água corrente e, após secagem, adicionou-se um volume de 150 µL de tampão Tris.NaOH na concentração de 10 mM (T1503, Sigma Aldrich, EUA).

Após homogeneização dos poços, a observância foi quantificada com o comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 690 nm, utilizando o espectrofotómetro EnSpire®. Os resultados foram apresentados como percentagem do conteúdo proteico total das culturas celulares submetidas aos extratos, em relação ao conteúdo proteico total das respetivas culturas controlo.

2.4. Morte celular

Os diferentes tipos de morte celular foram avaliados através da marcação dupla com anexina V (AnV) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com o iodeto de propídeo (IP), recorrendo à citometria de fluxo.

As células foram distribuídas em placas de seis poços (Sarstedt 83.3920, Alemanha) numa concentração de 500.000 células/poço e colocadas em contacto com os extratos. Após um período de incubação de 24 horas, os poços foram lavados com PBS. As células foram destacadas e concentradas, por centrifugação, a 2500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi decantado e adicionou-se um volume de 100 µL de tampão de ligação

(constituído por 0,01 M de Hepes [H7523, Sigma Aldrich, EUA], 0,14 nM de NaCl [S7653, Sigma Aldrich, EUA] e 0,25 nM de CaCl₂ [C4901, Sigma Aldrich, EUA], 2,5 µL de AnV FITC e 1 µL de IP (KIT Immunotech, França), durante 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Após este período, adicionou-se um volume de 400 µL de PBS. As suspensões foram homogeneizadas e analisadas no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, Becton Dickinson, EUA). Para a análise e quantificação da informação utilizou-se o software Paint-a-Gate™ 3.02, Machintosh Software (BD Biosciences, Becton Dickinson, EUA). Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de células vivas, em apoptose, em apoptose tardia/necrose e em necrose.

2.5. Ciclo celular

O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo, através da marcação das células com IP, um corante rotineiramente utilizado para a análise do DNA e do ciclo celular.

As células foram distribuídas em placas de seis poços numa concentração de 500.000 células/poço e colocadas em contacto com os extratos. Após um período de incubação de 24 horas, lavou-se com PBS. As células foram destacadas e concentradas, por centrifugação, a 2500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi decantado, adicionou-se um volume de 200 µL de etanol a 70%, com o tubo em agitação, e incubaram-se os tubos durante 30 minutos, a 4°C e no escuro. As células foram lavadas com 2 mL de PBS e a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi decantado, adicionou-se um volume de 500 µL de PI/RNase (Immunotech, França) e a suspensão foi homogeneizada e incubada a 37°C e no escuro.

A suspensão foi analisada no citómetro FACSCalibur, nos comprimentos de onda de excitação de 488 nm e de emissão de 582 nm. Para a quantificação da informação utilizou-se o *software* Paint-a-Gate™ 3.02, Machintosh Software. Os resultados foram apresentados sob a forma de percentagem de células na fase Pré-G₀, na fase G₀/G₁, na fase S ou na fase G₂/M.

2.6. Morfologia celular e avaliação qualitativa da citotoxicidade

As características morfológicas foram avaliadas com recurso à microscopia ótica, após coloração com o meio *May-Grunwald Giemsa*.

As células foram distribuídas numa placa de 12 poços (Sarstedt 83.3921, Alemanha), numa concentração de 143.000 células/mL, em 700 µL de meio DMEM, sobre uma lamela. Após adesão das células, foram adicionados os extratos e renovado o meio de cultura dos poços controlo. Procedeu-se a uma incubação por um período de 24 horas.

O sobrenadante foi decantado e lavaram-se as células com PBS. Adicionou-se um volume de 200 µL de solução de *May-Grunwald* (Laborclin, Brasil) e, após 3 minutos, adicionou-se igual volume de água ultrapura. O sobrenadante foi decantado e adicionou-se um volume de 400 µL de solução de *Giemsa* (Laborclin, Brasil), 3:10 mL de solução, diluída em água ultrapura. As lamelas foram lavadas com água corrente para remoção de excesso dos corantes e montadas em lâminas, usando o meio de montagem DAKO glycergel (DAKO, Dinamarca). As lâminas foram observadas ao microscópio ótico e fotografadas com uma câmara Nikon OS-Fi2 (Nikon, Tóquio, Japão) acoplada ao *software* NIS-Elements D (Nikon, Tóquio, Japão), com a ampliação de 100x.

Procedeu-se à avaliação qualitativa da citotoxicidade com base na observação de três fotografias por cada duas lâminas das diferentes condições. Foi aplicada a classificação descrita na norma ISO que orientou o planeamento do trabalho e que está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Determinação qualitativa da citotoxicidade de extratos.⁽²²⁾

Grau	Reatividade	Condição das culturas
0	Ausente	Grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular e sem redução do crescimento celular
1	Leve	Até 20% das células são arredondadas, leve perda da aderência e ausência de grânulos intracitoplasmáticos ou alterações morfológicas; ocasionalmente, presença de lise celular; leve inibição do crescimento celular
2	Ligeira	Até 50% das células são arredondadas, sem grânulos intracitoplasmáticos, sem lise celular marcada; inibição do crescimento celular até 50%
3	Moderada	Até 70% das células são arredondadas ou em lise celular; as camadas celulares não estão completamente destruídas, mas observa-se mais de 50% de inibição do crescimento celular
4	Severa	Destruição das camadas celulares completa ou quase completa

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software GraphPad Prism 8[®] (San Diego, EUA).

Foi considerado um valor de significância de 5% para todas as comparações e utilizou-se o teste *Shapiro-Wilk* para a avaliação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas.

Realizou-se a comparação da atividade metabólica das culturas celulares submetidas às diferentes concentrações dos estratos obtidos de cada sistema adesivo com as culturas celulares controlo, normalizadas a 100%, utilizando o teste *t-student* para uma amostra, nos casos em que se verificou uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Na ausência de normalidade optou-se pelo teste de *Wilcoxon*. Para cada tempo de estudo compararam-se os três sistemas adesivos nas diferentes concentrações e cada condição teste foi comparada nos três tempos de estudo. Para esta análise foi utilizado o teste ANOVA (do inglês, *analysis of variance*) de um ou dois fatores, conforme a sua aplicabilidade e após confirmação dos critérios de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando os pressupostos não foram verificados, foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Foram realizadas comparações múltiplas entre os grupos utilizando a correção de *Tukey* (para os testes paramétricos) e de *Dunn* (para os testes não paramétricos).

Compararam-se os resultados da viabilidade celular tendo por base os mesmos critérios e testes realizados para a atividade metabólica.

Relativamente às vias de morte e ciclo celular, realizou-se a comparação entre as condições teste e o grupo controlo, utilizando a ANOVA de um fator. Nas situações em que os seus pressupostos não foram verificados realizou-se o teste de *Kruskal-Wallis*. Realizaram-se, ainda, comparações múltiplas entre os grupos experimentais, utilizando os testes anteriores, com a respetiva correção de *Bonferroni* ou de *Dunn*, conforme a sua aplicabilidade.

Os resultados foram apresentados sob a forma de média e erro padrão.

3. Resultados

3.1. Atividade metabólica

Os resultados da avaliação da atividade metabólica das células da linha MDPC-23, obtidos através do ensaio do MTT, estão representados na Figura 1.

Após 2 horas de incubação, os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT determinaram uma diminuição significativa da atividade metabólica para $74,17 \pm 2,63\%$ ($p=0,010$) após exposição das culturas celulares à concentração de 100%. Após exposição aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 à concentração de 50% e de 100%, observou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica para $75,77 \pm 6,86\%$ ($p=0,039$) e para $23,49 \pm 1,41\%$ ($p<0,001$), respetivamente. Na concentração de 100% verificou-se que a atividade metabólica das células expostas aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 foi significativamente inferior à das células expostas aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT ($p=0,034$).

Após 24 horas de incubação, foi identificada uma diminuição significativa da atividade metabólica das culturas celulares expostas aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT, para valores de $82,64 \pm 1,65\%$ ($p=0,009$), após exposição à concentração de 25%, para $33,55 \pm 13,79\%$ ($p=0,041$), após exposição à concentração de 50%, e para $25,84 \pm 6,40\%$ ($p=0,007$), após exposição à concentração de 100%. Após exposição das culturas celulares aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 nas concentrações de 50% e de 100% identificou-se uma diminuição significativa da atividade metabólica para $10,40 \pm 3,36\%$ ($p=0,001$) e para $11,60 \pm 7,22\%$ ($p=0,001$), respetivamente. A exposição das culturas celulares aos extratos de Scotchbond™ Universal na concentração de 100% determinou uma diminuição significativa da atividade metabólica para $3,33 \pm 1,17\%$ ($p<0,001$). Para a exposição à concentração de 50%, a atividade metabólica das células expostas aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 foi significativamente inferior à das células expostas aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT ($p=0,044$) e de Scotchbond™ Universal ($p=0,008$).

Após 96 horas de incubação com os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT foi identificada uma diminuição significativa da atividade metabólica das células MDPC-23, após exposição às concentrações de 12,5%, de 25% e de 100%. Assim, a atividade metabólica desceu para $41,98 \pm 2,88\%$ ($p=0,003$), após exposição à concentração de 12,5%, para $0,85 \pm 0,04\%$ ($p<0,001$), após exposição à concentração de 25%, e para $2,03 \pm 0,97\%$ ($p<0,001$), após exposição à concentração de 100%. Relativamente aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 foi identificada uma diminuição significativa da atividade metabólica para $49,88 \pm 2,56\%$ ($p=0,003$), após exposição à concentração de 12,5%, para $2,61 \pm 1,75\%$ ($p<0,001$), após

exposição à concentração de 25%, para $1,22 \pm 0,50\%$ ($p < 0,001$), após exposição à concentração de 50%, e para $1,27 \pm 0,55\%$ ($p < 0,001$), após exposição à concentração de 100%. A exposição das culturas celulares aos extratos de Scotchbond™ Universal determinou uma diminuição significativa da atividade metabólica para $42,87 \pm 2,53\%$ ($p = 0,002$), após exposição à concentração de 12,5%, para $1,14 \pm 0,30\%$ ($p < 0,001$), após exposição à concentração de 25%, para $0,61 \pm 0,13\%$ ($p < 0,001$), após exposição à concentração de 50%, e para $1,49 \pm 0,55\%$ ($p < 0,001$), após exposição à concentração de 100%.

Os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT na concentração de 6,25% determinaram uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p = 0,012$). Na concentração de 12,5% verificou-se uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e do que durante 24 horas ($p = 0,002$). A concentração de 25% determinou uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p = 0,015$). Aquando a exposição à concentração de 50%, verificou-se uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após incubação durante 96 horas do que durante 2 horas ($p = 0,012$). Na concentração de 100%, a exposição durante 24 horas determinou a diminuição significativamente mais acentuada do metabolismo celular do que durante 2 horas ($p < 0,001$), assim como foi mais acentuada após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e do que durante 24 horas ($p = 0,005$).

Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 na concentração de 12,5% determinaram uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p = 0,002$) e do que durante 24 horas ($p = 0,004$). Após exposição à concentração de 25%, verificou-se uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e do que durante 24 horas ($p = 0,002$). A exposição à concentração de 50% determinou a diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 24 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$). Com a concentração de 100% verificou-se uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p = 0,028$).

Os extratos de Scotchbond™ Universal na concentração de 12,5% determinaram uma diminuição significativamente mais acentuada após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e do que durante 24 horas ($p < 0,001$). Com a concentração de 25% verificou-se uma diminuição significativamente mais acentuada após exposição durante 96

horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e do que durante 24 horas ($p < 0,001$). A exposição à concentração de 50% determinou uma diminuição significativamente mais acentuada após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p < 0,001$) e do que durante 24 horas ($p = 0,002$). Com a concentração de 100% verificou-se uma diminuição significativamente mais acentuada da atividade metabólica após exposição durante 96 horas do que durante 2 horas ($p = 0,01$).

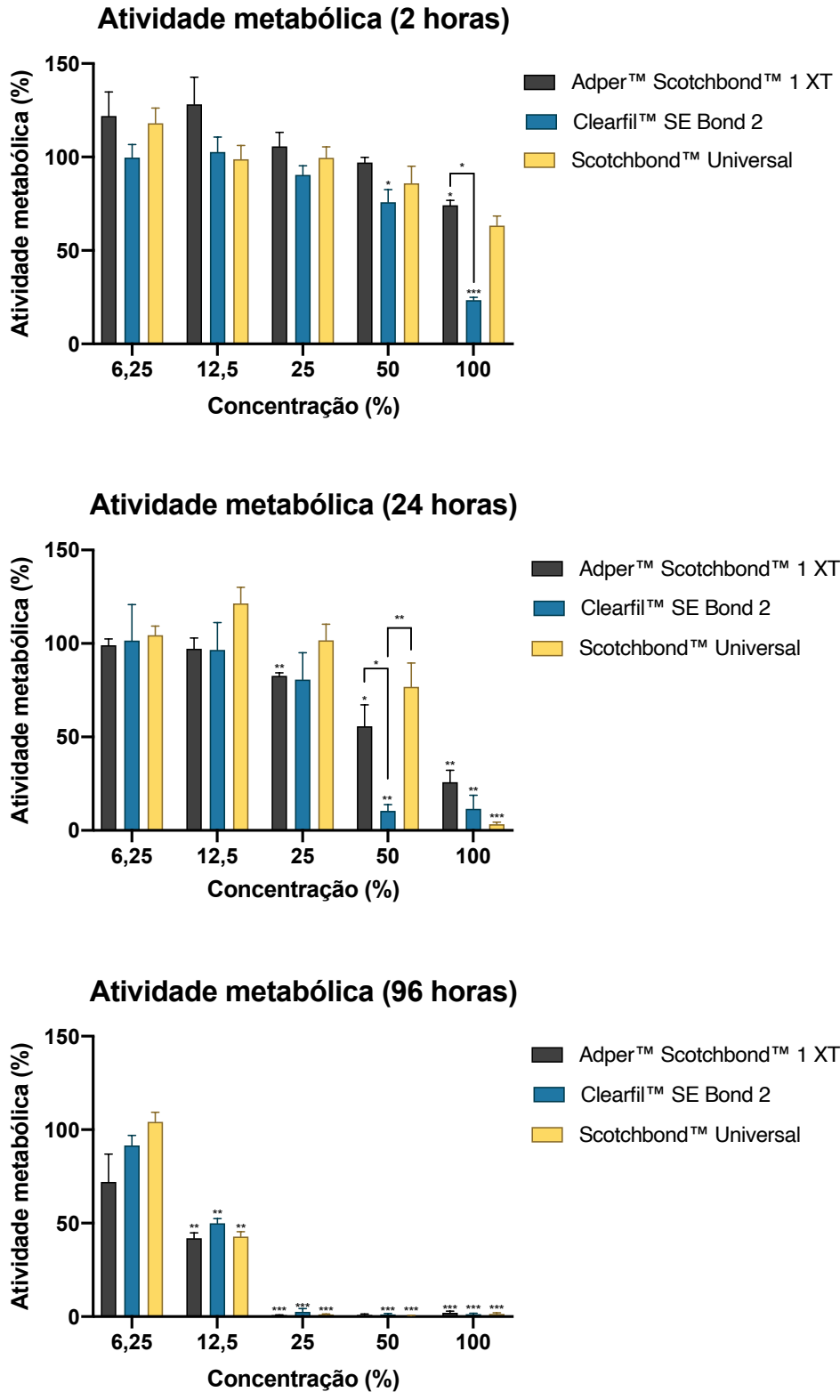


Figura 1. Atividade metabólica das células MDPC-23 após incubação durante 2, 24 e 96 horas com os extratos dos sistemas adesivos. Os resultados apresentados encontram-se sob a forma de média e erro padrão de quatro ensaios independentes. As diferenças significativas, em relação ao controle ou entre sistemas adesivos na mesma concentração, estão representadas com *, em que * significa $p < 0,05$, ** significa $p < 0,01$ e *** significa $p < 0,001$.

3.2. Viabilidade celular

Os resultados da avaliação da viabilidade celular das células da linha MDPC-23, obtidos através do ensaio da SRB, estão representados na Figura 2.

Os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT, de Clearfil™ SE Bond 2 e de Scotchbond™ Universal determinaram uma diminuição significativa da viabilidade celular após exposição às concentrações de 25% e de 50% durante 24 horas. Assim, foi identificada uma diminuição da viabilidade celular para $76,22 \pm 2,34\%$ ($p=0,002$), após exposição aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT na concentração de 25%, e para $61,18 \pm 2,98\%$ ($p=0,001$), após exposição aos extratos na concentração de 50%. Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram uma redução significativa da viabilidade celular para $39,33 \pm 5,69\%$ ($p=0,009$), após exposição à concentração de 25%, e para $20,01 \pm 7,69\%$ ($p=0,009$), após exposição à concentração de 50%. A incubação com os extratos de Scotchbond™ Universal determinou uma diminuição da viabilidade celular para $79,01 \pm 3,22\%$ ($p=0,007$), após exposição à concentração de 25%, e para $63,90 \pm 4,26\%$ ($p=0,003$), após exposição à concentração de 50%.

Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram, na concentração de 25%, uma diminuição significativamente mais acentuada da viabilidade celular do que a exposição aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT ($p=0,002$) e de Scotchbond™ Universal ($p=0,001$). Também com a concentração de 50%, os extratos de extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram uma diminuição significativamente mais acentuada da viabilidade celular do que a exposição aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT ($p<0,001$) e de Scotchbond™ Universal ($p<0,001$).

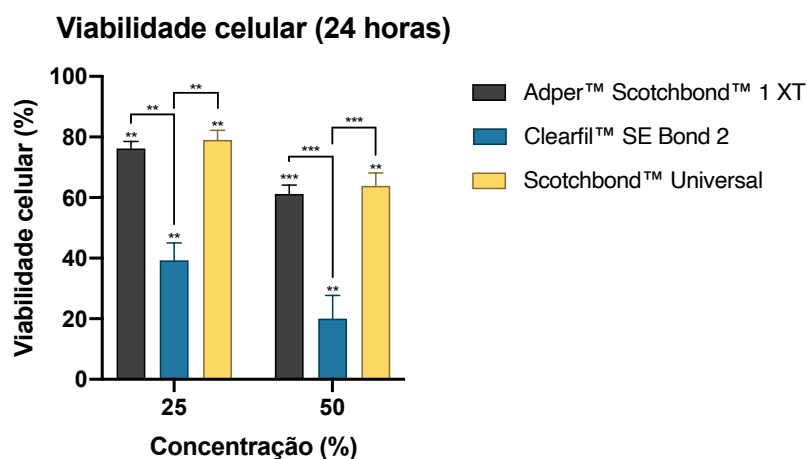


Figura 2. Viabilidade celular das células MDPC-23 submetidas aos extratos dos sistemas adesivos durante 24 horas. Os resultados apresentados encontram-se sob a forma de média e erro padrão de três ensaios independentes. As diferenças significativas, em relação ao controlo ou entre sistemas adesivos para a mesma concentração, estão representadas com *, em que ** significa $p<0,01$ e *** significa $p<0,001$.

3.3. Morte celular

Os resultados relativos à avaliação dos tipos de morte celular das células da linha MDPC-23, obtidos por citometria de fluxo, estão representados na Figura 3.

Nas culturas celulares controlo observou-se um número percentual de células viáveis de $80,5 \pm 1,6\%$, de células em apoptose de $9,5 \pm 1,2\%$, de células em apoptose tardia/necrose de $2,8 \pm 0,6\%$ e de células em necrose de $7,2 \pm 1,9\%$. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as culturas celulares expostas aos extratos e as culturas celulares controlo.

Após exposição das culturas celulares aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT na concentração de 25% identificou-se uma diminuição do número de células viáveis para $73,3 \pm 9,5\%$. Esta diminuição foi acompanhada por um aumento da percentagem de células em apoptose, para $14,2 \pm 4,2\%$, e em necrose, para $9,8 \pm 4,6\%$. Após exposição das culturas aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT na concentração de 50% identificou-se uma diminuição do número de células viáveis, para $67,3 \pm 9,0\%$, e um aumento da percentagem de células em apoptose, para $18,7 \pm 6,7\%$, em apoptose tardia/necrose, para $3,8 \pm 0,3\%$, e em necrose, para $10,2 \pm 5,1\%$.

A exposição das culturas celulares aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 na concentração de 25% determinou a diminuição do número percentual de células viáveis, para $64,5 \pm 7,4\%$. Esta diminuição foi acompanhada por um aumento da percentagem de células em apoptose, para $21,2 \pm 5,2\%$, em apoptose tardia/necrose, para $4,0 \pm 0,6\%$, e em necrose, para $10,3 \pm 4,3\%$. Após exposição das culturas aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 na concentração de 50% identificou-se uma diminuição da percentagem de células viáveis, para $60,5 \pm 9,0\%$. Esta diminuição foi acompanhada por um aumento do número percentual de células em apoptose, para $21,5 \pm 6,2\%$, em apoptose tardia/necrose, para $4,3 \pm 0,9\%$, e em necrose, para $13,7 \pm 4,2\%$.

Após exposição das culturas celulares aos extratos de Scotchbond™ Universal na concentração de 25% identificou-se uma diminuição do número percentual de células viáveis, para $70,8 \pm 5,9\%$, e um aumento do número percentual de células em apoptose, para $17,3 \pm 3,6\%$, em apoptose tardia/necrose, para $3,0 \pm 0,5\%$, e em necrose, para $8,8 \pm 2,8\%$. A exposição das culturas aos extratos de Scotchbond™ Universal na concentração de 50% determinou uma redução do número percentual de células viáveis, para $68,5 \pm 7,1\%$. Esta diminuição foi acompanhada pelo aumento da percentagem de células em apoptose, para $19,7 \pm 3,4\%$, em apoptose tardia/necrose, para $3,8 \pm 0,9\%$, e em necrose, para $8,0 \pm 4,0\%$.

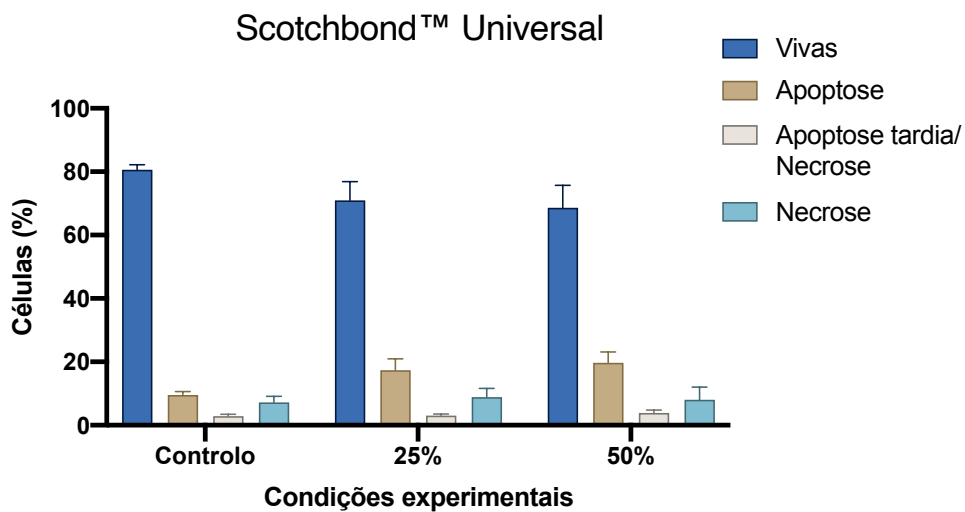
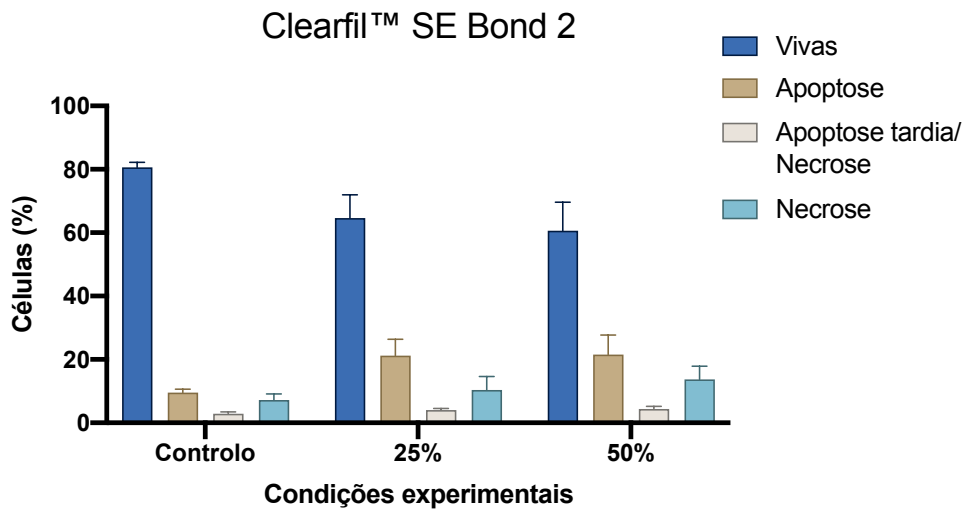
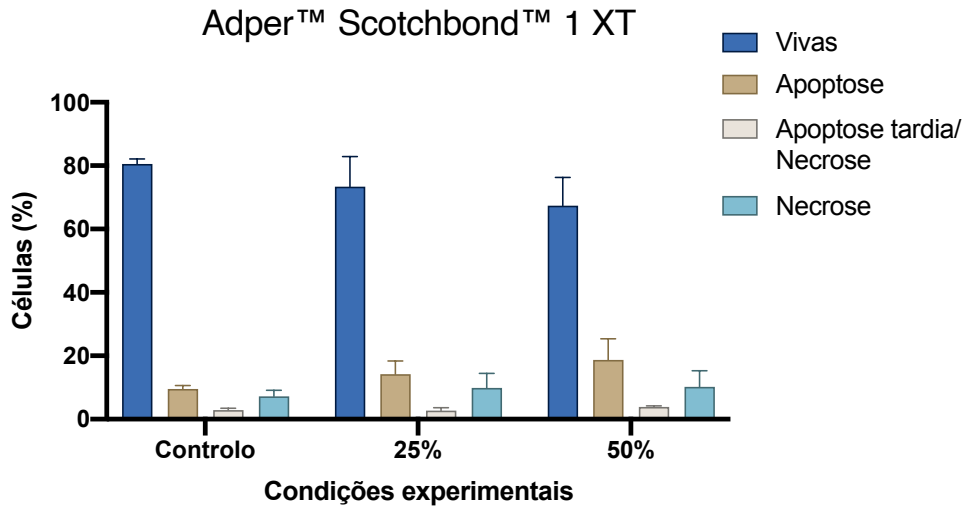


Figura 3. Tipos de morte celular das células MDPC-23 submetidas aos extratos dos sistemas adesivos, após 24 horas. Os resultados apresentados encontram-se sob a forma de média e erro padrão de três ensaios independentes.

3.4. Ciclo celular

Os resultados da avaliação do ciclo celular das células da linha MDPC-23, obtidos por citometria de fluxo, estão representados na Figura 4.

Nas culturas celulares controlo foi identificado um número percentual de células em fase Pré-G0 de $3,0 \pm 2,0\%$, em fase G0/G1 de $46,5 \pm 9,5\%$, em fase S de $33,0 \pm 11,0\%$ e em fase G2/M de $21,0 \pm 1,5\%$. Não se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre as culturas controlo e as culturas expostas aos extratos nas diferentes concentrações.

A exposição das culturas celulares aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT na concentração de 25% determinou uma diminuição do número percentual de células em fase Pré-G0, para $2,0 \pm 2,0\%$, em fase S, para $26,0 \pm 14,0\%$, e em fase G2/M, para $16,5 \pm 3,0\%$. Esta diminuição foi acompanhada por um aumento da percentagem de células em fase G0/G1, para $58,0 \pm 17,0\%$. Após exposição das culturas celulares à concentração de 50% identificou-se uma diminuição do número percentual de células em fase Pré-G0, para $2,8 \pm 1,8\%$, em fase S, para $27,0 \pm 16,0\%$, e em fase G2/M, para $13,3 \pm 0,8\%$. Esta diminuição foi acompanhada por um aumento do número percentual de células em fase G0/G1, para $60,0 \pm 16,0\%$.

Após exposição das culturas celulares aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2 na concentração de 25% foi identificado um aumento do número percentual de células em fase Pré-G0, para $3,8 \pm 2,3\%$, e em fase G0/G1, para $63,8 \pm 10,3\%$. Este aumento foi acompanhado por uma diminuição do número percentual de células em fase S, para $24,0 \pm 11,3\%$, e em fase G2/M, para $12,5 \pm 1,0\%$. Após exposição das culturas celulares à concentração de 50% identificou-se um aumento do número percentual de células em fase Pré-G0, para $3,3 \pm 2,3\%$, e em fase G0/G1, para $67,5 \pm 10,5\%$. Por outro lado, foi identificada uma diminuição do número percentual de células em fase S, para $11,0 \pm 0,3\%$, e em fase G2/M, para $21,3 \pm 10,3\%$.

A exposição das culturas celulares aos extratos de Scotchbond™ Universal na concentração de 25% determinou um aumento do número percentual de células em fase Pré-G0, para $3,3 \pm 1,8\%$, e em fase G0/G1, para $61,5 \pm 9,0\%$. Este aumento foi acompanhado por uma diminuição do número percentual de células em fase S para $27,0 \pm 8,5\%$, e em fase G2/M, para $18,0 \pm 0,5\%$. Após exposição à concentração de 50% foi identificado um aumento do número percentual de células em fase G0/G1, para $61,5 \pm 1,8\%$, e uma diminuição do número percentual de células em fase Pré-G0, para $2,8 \pm 1,8\%$, em fase S, para $23,0 \pm 9,8\%$, e em fase G2/M, para $15,8 \pm 0,8\%$.

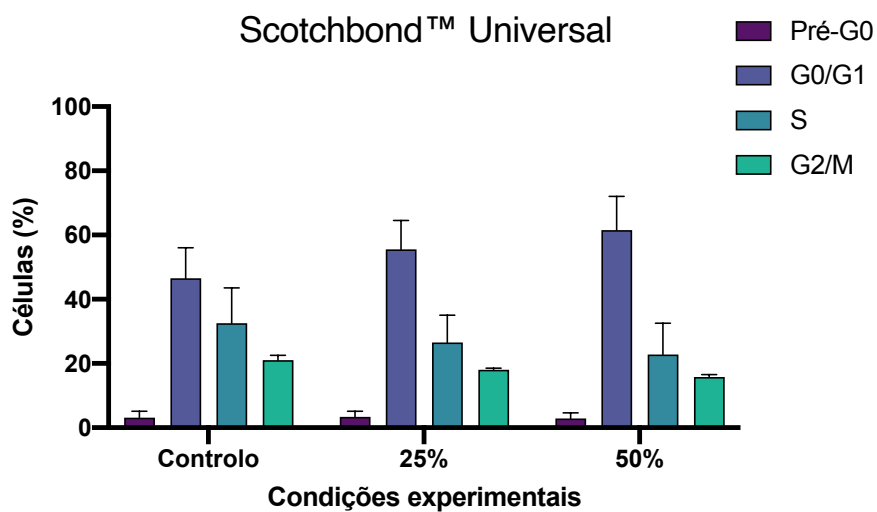
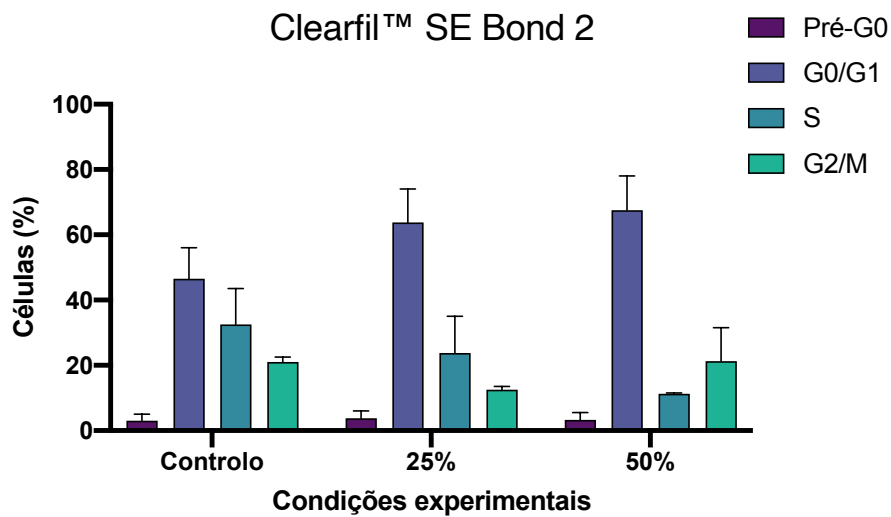
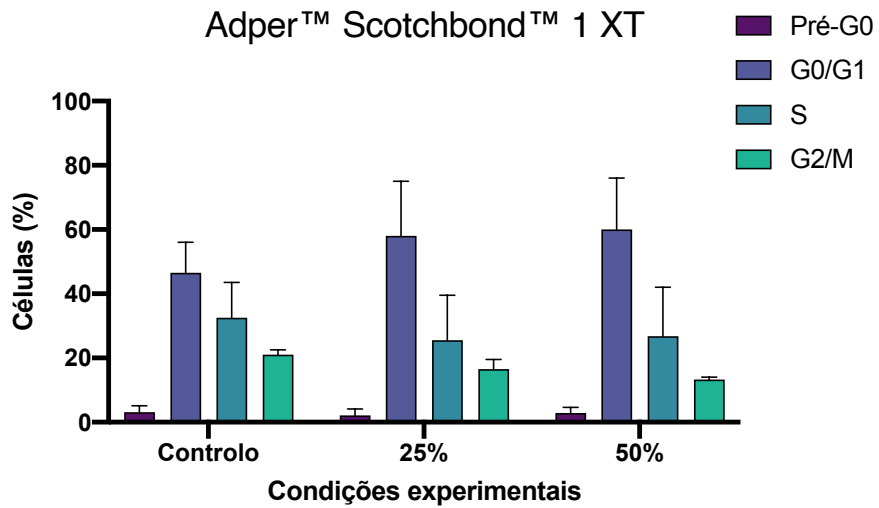


Figura 4. Fases do ciclo celular das células MDPC-23 submetidas aos extratos dos sistemas adesivos após 24 horas. Os resultados apresentados encontram-se sob a forma de média e erro padrão de dois ensaios independentes.

3.5. Morfologia celular e avaliação qualitativa da citotoxicidade

Os resultados da avaliação da morfologia celular e da avaliação qualitativa da citotoxicidade das células da linha MDPC-23 estão apresentados na Tabela 4. Estes resultados representam a média resultante da aplicação da classificação, previamente descrita, em fotografias de células submetidas às diferentes condições, em três ensaios independentes.

Tabela 4. Avaliação qualitativa da citotoxicidade das culturas celulares submetidas aos extratos.

Condição experimental		Grau de citotoxicidade
Controlo		0 (ausente)
Adper™ Scotchbond™ 1 XT	25%	1 (leve)
	50%	2 (ligeira)
Clearfil™ SE Bond 2	25%	3 (moderada)
	50%	4 (severa)
Scotchbond™ Universal	25%	2 (ligeira)
	50%	2 (ligeira)

Os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT, na concentração de 25%, foram classificados com grau 1 de citotoxicidade, tendo-se identificado, nas imagens obtidas, uma reduzida percentagem de células arredondadas, com perda de aderência ou alterações morfológicas. Os extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT, na concentração de 50%, e os de Scotchbond™ Universal, nas concentrações de 25% e de 50%, foram associados ao grau 2 de citotoxicidade, com inibição do crescimento celular próxima de 50%. Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2, na concentração de 25%, foram classificados com grau 3 de citotoxicidade, e, na concentração de 50%, foram associados ao grau 4, onde se identificou uma marcada inibição do crescimento celular, com alterações morfológicas e uma destruição das camadas celulares quase completa. Na Figura 5 encontram-se fotografias representativas da classificação atribuída.

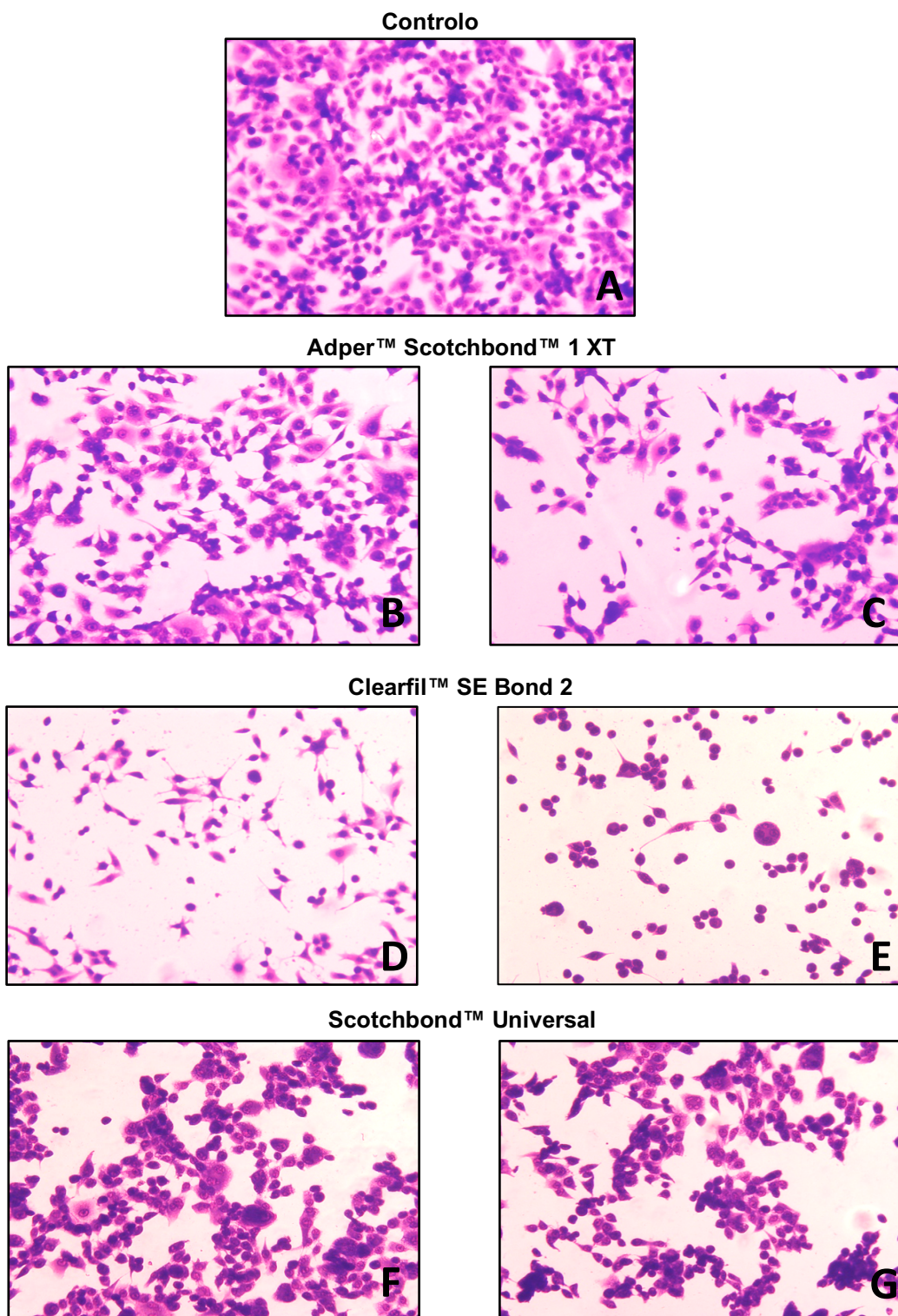


Figura 5. Imagens de lamelas de células MDPC-23 em cultura, após coloração com o meio *May-Grunwald Giemsa*, submetidas aos extratos de Adper™ Scotchbond™ 1 XT, na concentração de 25% (B) e de 50% (C), de Clearfil™ SE Bond 2, na concentração de 25% (D) e de 50% (E), e de Scotchbond™ Universal, na concentração de 25% (F) e de 50% (G). O grupo controlo não foi exposto a nenhum extrato (A). As imagens foram obtidas por microscopia ótica, com uma ampliação de 100x, e são representativas de três ensaios independentes.

4. Discussão

Os trabalhos experimentais *in vitro* compreendem desenhos de investigação que permitem a realização de estudos de uma variável, sob condições controladas. Estes trabalhos não permitem, no entanto, a reprodução da dinâmica completa do sistema existente *in vivo*, pelo que importa referir que um material que *in vitro* se revela tóxico não é, necessariamente, um material com igual capacidade tóxica quando usado em ambiente clínico.⁽²⁷⁾

Na fase inicial deste projeto, durante alguns ensaios de adaptação dos protocolos de preparação e utilização dos extratos dos sistemas adesivos, obtiveram-se resultados pouco consistentes. Apesar de a norma ISO utilizada na planificação deste projeto estabelecer que os extratos não devem ser processados, os precipitados gerados no meio de cultura, após incubação com os *pellets*, determinaram a necessidade de uma centrifugação prévia à sua aplicação sobre as culturas celulares. Este procedimento permitiu, ainda, prever uma maior toxicidade, associada especialmente aos extratos de Clearfil™ SE Bond 2, uma vez que o meio de cultura alterava de cor imediatamente após o contacto com os *pellets*.

Os resultados da avaliação da atividade metabólica revelaram uma diminuição da mesma em função do tempo e da concentração dos extratos dos três adesivos estudados. Os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 provocaram uma alteração no metabolismo celular maior do que a observada com os restantes adesivos. No período de incubação de 24 horas e na concentração 50% identificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 e os extratos dos outros adesivos, determinando a execução dos restantes protocolos nestas condições experimentais.

Apesar de ampla e frequentemente utilizado como único ensaio, o ensaio do MTT revela-se insuficiente na avaliação da citotoxicidade dos materiais, uma vez que a diminuição da atividade metabólica não resulta, necessariamente, em morte celular.⁽²⁸⁾

Os ensaios de viabilidade celular realizados vieram corroborar os do metabolismo celular. Foi identificada uma diminuição da viabilidade celular após exposição aos adesivos e nas diferentes condições experimentais, face às culturas controlo, sendo que os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram, consistentemente, reduções significativamente mais acentuadas da viabilidade celular.

Com os estudos de citometria não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas quer relativamente à quantificação dos tipos de morte celular quer relativamente

às fases do ciclo celular. No entanto, foi observada a presença de um menor número de células vivas e, conseqüentemente, um maior número de células em apoptose, apoptose tardia/necrose ou em necrose e, durante a avaliação do ciclo celular, foi observado um maior número de células na fase G0/G1, em detrimento das fases S e G2/M, o que justifica as imagens obtidas para a avaliação da morfologia celular e a inibição do crescimento celular das culturas submetidas aos extratos dos sistemas adesivos.

Assim, apesar de os sistemas adesivos não terem determinado diferenças significativas entre os tipos de morte celular identificados nas culturas celulares expostas aos mesmos, quando comparadas com as culturas celulares controle, estes revelaram ser responsáveis pela diminuição do metabolismo e viabilidade celulares, bem como pela inibição do crescimento das culturas. Dos três sistemas estudados, o Clearfil™ SE Bond 2 demonstrou ser o adesivo com maior citotoxicidade.

Neste estudo foi adotado o método de extratos e foram, inicialmente, estudadas diversas concentrações dos mesmos, utilizando uma linha celular do tipo odontoblastos. Apesar de, clinicamente, os sistemas adesivos não serem aplicados sobre a polpa dentária, em cavidades muito profundas (justapulares) poderá ocorrer a difusão do sistema adesivo, através dos túbulos dentinários, alcançando a mesma.^(12, 15)

Desta forma, importa reconhecer as limitações do presente estudo relativamente à transposição dos resultados para o ambiente clínico. O sistema adesivo Adper™ Scotchbond™ 1 XT carece de condicionamento ácido prévio da superfície dentária. O condicionamento da dentina com ácido ortofosfórico é agressivo, sendo esta agressividade diretamente proporcional à concentração e ao tempo de condicionamento da superfície.⁽²¹⁾ A exposição resultante dos túbulos dentinários poderá facilitar a difusão do adesivo e o eventual alcance da polpa dentária.⁽¹²⁾ Apesar de não obrigatório, o sistema Scotchbond™ Universal poderá, também, ser aplicado sobre dentina previamente condicionada com ácido ortofosfórico, sendo que, neste caso, se levantam as mesmas preocupações. Já o Clearfil™ SE Bond 2, apesar dos resultados obtidos, apresenta, clinicamente, uma barreira protetora adicional, a *smear layer*, resultante da preparação mecânica do substrato. A integração desta camada na interface adesiva e a dissolução do adesivo pela mesma constitui uma barreira à progressão do adesivo em direção à polpa dentária, o que pode determinar uma menor citotoxicidade.⁽¹⁸⁾

Existem alguns estudos *in vivo*^(29, 30) sobre a difusão de componentes resinosos no interior dos túbulos dentinários e conseqüente alcance da polpa dentária. Tem sido ainda referido que o grau de conversão dos adesivos simplificados, quando comparados com adesivos convencionais, é menor.⁽³¹⁾ No entanto, são necessários estudos adicionais, que

visem o estudo da difusão dentinária dos adesivos *in vitro*, idealmente com simulação da pressão pulpar, o que permitirá avaliar, numa perspetiva mais próxima da realidade clínica, a citotoxicidade dos sistemas adesivos.

Na Literatura encontram-se ainda alguns estudos *in vitro* que pretendem avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos. Em trabalhos publicados nos quais se utilizou a metodologia de extratos, de contacto direto ou de contacto indireto, são diversos os resultados e conclusões. No estudo de Koulaouzidou e colaboradores⁽³²⁾, os sistemas adesivos do tipo condicionar e lavar determinaram uma maior citotoxicidade quando comparados com sistemas adesivos autocondicionantes. No entanto, outros autores reportaram os sistemas adesivos autocondicionantes como aqueles aos quais se associou uma maior citotoxicidade.^(19, 33, 34) Pagano e colaboradores⁽²⁰⁾ desenvolveram um estudo cujos resultados revelaram que o sistema adesivo universal utilizado determinou uma menor citotoxicidade. No entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos quando se tentou estabelecer uma comparação com outros sistemas adesivos em estudo. Foram ainda publicados estudos cujos resultados revelaram que os sistemas condicionar e lavar e os adesivos autocondicionantes determinaram igual citotoxicidade para as culturas celulares.^(31, 35) Em estudos que desenvolveram ensaios com utilização de uma barreira dentinária, os sistemas adesivos do tipo condicionar e lavar determinaram uma maior citotoxicidade quando comparados com sistemas autocondicionantes.⁽³⁶⁻³⁸⁾

Como nos estudos referidos a citotoxicidade foi frequentemente avaliada unicamente pela atividade metabólica, a interação que os adesivos apresentam em contacto com as culturas celulares permanece pouco estudada. Os resultados do presente estudo demonstram que a diminuição da viabilidade celular e a citotoxicidade dos adesivos relaciona-se com a indução da morte celular, traduzida pelo aumento percentual de células em apoptose e em necrose. Para além disso, mesmo após exposição a extratos dos adesivos de menor concentração, as células vivas presentes revelaram alterações no ciclo celular, com uma redução de células em fase S e G2/M, ou seja, a redução de células com capacidade de divisão e proliferação. Desta forma, os adesivos não só alteraram o metabolismo das culturas como também impediram a normal propagação das mesmas. Clinicamente, esta citotoxicidade poderá impedir a ocorrência de importantes processos fisiológicos, como a dentinogénese reparadora, pela diminuição da viabilidade celular, através da redução da capacidade de divisão e propagação das células progenitoras dos odontoblastos. Estas alterações ocorreram em dependência do adesivo, onde os extratos de Clearfil™ SE Bond 2 determinaram uma inversão percentual mais acentuada dos parâmetros avaliados, comparando com os restantes extratos avaliados.

Caldas e colaboradores⁽¹⁸⁾, em 2018, através de um estudo do tipo revisão sistemática sobre a citotoxicidade de sistemas adesivos, concluíram que um número considerável de estudos possuía uma metodologia frágil, sendo que apenas quatro dos dez estudos selecionados seguiram as orientações da norma ISO 10993-5, que estabelece os princípios para a avaliação biológica de dispositivos médicos. Os autores constataram que foram adotadas diversas metodologias, com diferentes linhas celulares, protocolos de extração e de exposição das culturas celulares aos sistemas adesivos, tendo ainda sido reportado o uso de diferentes ensaios na avaliação da viabilidade celular.

Adicionalmente, são diversos os sistemas adesivos comercialmente disponíveis, com múltiplas formulações, mesmo quando classificados como seguindo a mesma estratégia adesiva. Assim, a conjugação destes fatores pode, por si só, justificar a variabilidade de resultados constatada. No entanto, parece ser consensual que em estudos de contacto direto, de contacto indireto ou de extratos, os sistemas adesivos em que o *primer* se apresenta separado da resina fluída poderão determinar uma maior citotoxicidade por maior reatividade do primeiro. Todavia, esta reação está dependente de fatores adicionais de grande relevo, tal como o pH e os monómeros funcionais presentes.⁽³⁹⁾ Já nos estudos que utilizam uma barreira dentinária, não parece existir uma relação direta entre a citotoxicidade e a capacidade de dissolução da *smear layer* ou o pH, mas sim com a espessura da barreira, sendo a citotoxicidade inversamente proporcional à mesma. Para além disso, o protocolo de esterilização determina a conservação ou destruição das fibras de colagénio dentinárias e, consequentemente, a capacidade de infiltração do sistema adesivo.⁽³⁶⁾

O presente estudo revela-se inovador ao avaliar comparativamente as três modalidades adesivas comercialmente disponíveis. O sistema adesivo autocondicionante determinou maior citotoxicidade para as culturas celulares. No entanto, as diferenças estatisticamente significativas da citotoxicidade ao nível do metabolismo e viabilidade celulares não foram acompanhadas de alterações significativas nas vias de morte e ciclo celular. São raros os trabalhos com avaliação das vias de morte e ciclo celular em estudos de citotoxicidade de sistemas adesivos e, com o presente estudo, não se verificaram alterações significativas das culturas celulares nestes parâmetros após exposição aos extratos dos adesivos. O ensaio do MTT é, frequentemente, o único ensaio realizado. No entanto, e como já referido, este ensaio é insuficiente para a avaliação da citotoxicidade. Assim, a avaliação da viabilidade celular é um ensaio complementar e necessário para uma maior robustez da análise pretendida. A avaliação qualitativa da citotoxicidade é um parâmetro raramente avaliado, mas é sugerida pela norma ISO que orienta a avaliação *in vitro* de dispositivos médicos, constituindo um elemento adicional e onde o sistema adesivo autocondicionante

revelou um maior grau de reatividade perante as culturas celulares, com inibição marcada da proliferação celular.

5. Conclusão

O presente trabalho permitiu confirmar a citotoxicidade *in vitro* do Adper™ Scotchbond™ 1 XT, do Clearfil™ SE Bond 2 e do Scotchbond™ Universal, aplicados sob a forma de extratos em culturas de células MDPC-23. Esta citotoxicidade revelou ser diretamente proporcional à concentração dos extratos e ao tempo de incubação com os mesmos.

Apesar de as condições de avaliação de citotoxicidade dos adesivos ser diferente das da realidade clínica de utilização destes materiais, a sua utilização em cavidades profundas justapulpares, em dentes com câmaras pulpares amplas e em dentição decídua ou permanente jovem, perante a presença de túbulos dentinários de maiores dimensões, deve ser ponderada.

Na seleção clínica do sistema adesivo recomenda-se considerar a dentição e o substrato dentário presente, bem como a profundidade das cavidades dentinárias e a proximidade com a polpa dentária. A utilização dos sistemas adesivos em cavidades justapulpares deve ser cautelosa.

6. Agradecimentos

Ao Instituto de Biofísica e ao Instituto de Clínica Integrada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra por disponibilizarem os meios necessários à concretização deste projeto.

7. Referências bibliográficas

1. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *J Adhes Dent*. 2020;22(1):7-34.
2. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials*. 2011;27(1):17-28.
3. Milia E, Cumbo E, Cardoso RJ, Gallina G. Current dental adhesives systems. A narrative review. *Curr Pharm Des*. 2012;18(34):5542-52.
4. Bedran-Russo A, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Teixeira EC. An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth-Adhesive Interface. *Dental clinics of North America*. 2017;61(4):713-31.
5. Elias ST, Santos AF, Garcia FC, Pereira PN, Hilgert LA, Fonseca-Bazzo YM, et al. Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. *Braz Dent J*. 2015;26(2):160-8.
6. Carrilho E, Cardoso M, Marques Ferreira M, Marto CM, Paula A, Coelho AS. 10-MDP Based Dental Adhesives: Adhesive Interface Characterization and Adhesive Stability-A Systematic Review. *Materials (Basel)*. 2019;12(5).
7. Cadenaro M, Maravic T, Comba A, Mazzoni A, Fanfoni L, Hilton T, et al. The role of polymerization in adhesive dentistry. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2019;35(1):e1-e22.
8. Masarwa N, Mohamed A, Abou-Rabii I, Abu Zaghlal R, Steier L. Longevity of Self-etch Dentin Bonding Adhesives Compared to Etch-and-rinse Dentin Bonding Adhesives: A Systematic Review. *The journal of evidence-based dental practice*. 2016;16(2):96-106.
9. Zhang ZY, Tian FC, Niu LN, Ochala K, Chen C, Fu BP, et al. Defying ageing: An expectation for dentine bonding with universal adhesives? *Journal of Dentistry*. 2016;45:43-52.
10. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(6):544-54.
11. Pupo YM, Bernardo CFF, de Souza F, Michel MD, Ribeiro CNM, Germano S, et al. Cytotoxicity of Etch-and-Rinse, Self-Etch, and Universal Dental Adhesive Systems in Fibroblast Cell Line 3T3. *Scanning*. 2017;2017:9650420.

12. da Fonseca Roberti Garcia L, 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.
13. Aranha AM, Giro EM, Hebling J, Lessa FC, Costa CA. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative composite resin on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(5):461-6.
14. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjaderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2018;34(1):78-96.
15. Lee BS, Jan YD, Huang GS, Huang CH, Chou HY, Wang JS, et al. Effect of dentin bonding agent diffusing through dentin slices on the reactive oxygen species production and apoptosis of pulpal cells. *J Formos Med Assoc*. 2015;114(4):339-46.
16. Leite M, Costa CAS, 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.
17. Paula A, Laranjo M, Marto CM, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Gonçalves AC, et al. Biodentine™ Boosts, WhiteProRoot® MTA Increases and Life® Suppresses Odontoblast Activity. *Materials (Basel)*. 2019;12(7).
18. Caldas IP, Alves GG, Barbosa IB, Scelza P, de Noronha F, Scelza MZ. In vitro cytotoxicity of dental adhesives: A systematic review. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2019;35(2):195-205.
19. Bianchi L, Ribeiro AP, Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(8):1498-507.
20. Pagano S, Lombardo G, Balloni S, Bodo M, Cianetti S, Barbati A, et al. Cytotoxicity of universal dental adhesive systems: Assessment in vitro assays on human gingival fibroblasts. *Toxicology in Vitro*. 2019;60:252-60.
21. Natalia Gateva AG, Pavel Stanimirov, Rossitza Kabaktchieva, Ivan Raichev. Effect of etching time and acid concentration on micromorphological changes in dentin of both dentitions. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*. 2016.
22. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.
23. ATCC® Animal Cell Culture Guide. 2014.
24. Freshney RI. *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Techniques*. 2005.

25. Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 1999;15(6):434-41.
26. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Dagna A, Colombo M, Chiesa M. Biocompatibility of a new pulp capping cement. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014;5(2):69-76.
27. Faggion CM, Jr. Guidelines for reporting pre-clinical in vitro studies on dental materials. *The journal of evidence-based dental practice*. 2012;12(4):182-9.
28. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013;39(4):478-83.
29. Gwinnett AJ, Tay F. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent*. 1998;11 Spec No:S35-44.
30. Tay FR, Gwinnett AJ, Pang KM, Wei SH. Structural evidence of a sealed tissue interface with a total-etch wet-bonding technique in vivo. *J Dent Res*. 1994;73(3):629-36.
31. Wegehaupt FJ, Lunghi N, Belibasakis GN, Attin T. Influence of light-curing distance on degree of conversion and cytotoxicity of etch-and-rinse and self-etch adhesives. *BMC Oral Health*. 2016;17(1):12.
32. Koulaouzidou EA, Helvatjoglu-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *Eur J Dent*. 2009;3(1):3-9.
33. Almaroof A, Niazi SA, Rojo L, Mannocci F, Deb S. Evaluation of dental adhesive systems incorporating an antibacterial monomer eugenyl methacrylate (EgMA) for endodontic restorations. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2017;33(5):e239-e54.
34. Lee Y, An SY, Park YJ, Yu FH, Park JC, Seo DG. Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line. *Scanning*. 2016;38(1):36-42.
35. 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. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2013;29(9):980-90.
36. 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.
37. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*. 2009;25(6):533-43.
38. Tuncer S, Demirci M, Schweikl H, Erguven M, Bilir A, Kara Tuncer A. Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure in vitro. *Clin Oral Investig*. 2012;16(6):1635-46.

39. Kusdemir M, Gunal S, Ozer F, Imazato S, Izutani N, Ebisu S, et al. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dent Mater J.* 2011;30(6):799-805.

8. Abreviaturas, símbolos e fórmulas

ANOVA: *Analysis of variance*

AnV: Anexina V

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

FBS: *Fetal bovine serum*

FITC: isotiocianato de fluoresceína

IP: iodeto de propídeo

ISO: *International Organization for Standardization*

MDPC-23: *Mouse dental papilla cell -23*

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS: *Phosphate buffered saline*

PVC: *Polyvinyl Chloride*

SRB: Sulforrodamina B