

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese

**Comportamento celular na presença de materiais poliméricos em contato com
dentina bovina hígida**

Ricardo Alfredo Carrillo Cotto

Pelotas, 2017

Ricardo Alfredo Carrillo Cotto

**Comportamento celular na presença de materiais poliméricos em contato com
dentina bovina hígida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Dentística.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Etges

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Santos Jardim

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas/Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C317c Cotto, Ricardo Alfredo Carrillo

Comportamento celular na presença de materiais poliméricos em contato com dentina bovina hígida / Ricardo Alfredo Carrillo Cotto ; Adriana Etges, orientadora ; Rafael Ratto de Moraes, Patrícia Santos Jardim, coorientadores. — Pelotas, 2017.

76 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Citotoxicidade. 2. Materiais poliméricos. 3. Resinas compostas. 4. Adesivos dentários. 5. Grau de conversão. I. Etges, Adriana, orient. II. Moraes, Rafael Ratto de, coorient. III. Jardim, Patrícia Santos, coorient. IV. Título.

Black : D151

Ricardo Alfredo Carrillo Cotto

Comportamento celular na presença de materiais poliméricos em contato com dentina bovina hígida

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24/02/2017

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Etges (Presidente)
Doutora em Patologia Bucal pela Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci (PPGO)
Doutor em Odontologia/Cariologia pela Universidade de Campinas

Prof. Dr. Alexandre Severo Masotti (PPGO)
Doutor em Materiais Odontológicos pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Josué Martos (externo)
Doutor em Estomatologia pela Universidade de Granada

Dr^a. Aline Ogliari (externo)
Doutora em Odontologia (área de concentração Materiais Odontológicos) pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fábio Garcia Lima (suplente)
Doutor em Dentística Restauradora pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Lísia Lorea Valente (suplente)
Doutora em Odontologia (área de concentração Dentística Restauradora) pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a Deus pelo infinito amor.

Agradecimentos

À **Universidade Federal de Pelotas (UFPel)**, por meio de seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Pedro Rodrigues Curi Hallal.

À **Faculdade de Odontologia**, na pessoa da Profa. Dra. Adriana Etges.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa do Coordenador do Curso Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes.

Aos laboratórios que me acolheram e me possibilitaram executar esta tese: **Centro de Desenvolvimento e Controle de Biomateriais (CDC-Bio)**, **Núcleo de Biologia Celular e Tecidual (NBCT)** e o **Laboratório de Microbiologia Oral**, localizados nas dependências da Faculdade de Odontologia da UFPel.

À minha Orientadora, **Profa. Dra. Adriana Etges**.

Ao meu coorientador (número 1), **Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes**.

À minha coorientadora (número 2), **Profa. Dra. Patrícia Santos Jardim**.

À Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado no Brasil.

Aos meus centros de ensino.

Aos meus professores amigos.

Aos meus colegas amigos.

Aos meus amigos estrangeiros.

Aos meus amigos.

À minha família.

Aos meus pais.

Aos meus filhos.

À Universidade de San Carlos da Guatemala (USAC).

À Faculdade de Odontologia da USAC.

A DEUS.

**“Vive como se fosses morrer amanhã. Aprende
como se fosses viver para sempre.”**

(MAHATMA GANDHI)

Notas Preliminares

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2013, adotando o Nível de Descrição 4 – estrutura em Artigos, descrita no Apêndice D do referido manual. <<http://sisbi.ufpel.edu.br/?p=documentos&i=7>> Acesso em: 01 de janeiro de 2017.

O projeto de pesquisa contido nesta dissertação é apresentado em sua forma final após qualificação realizada em 21 de novembro de 2013 e aprovado pela Banca Examinadora composta pelas Professoras Doutoras Adriana Etges, Sandra Chaves Tarquínio e Giana da Silveira Lima.

Resumo

CARRILLO COTTO, Ricardo Alfredo. **Comportamento celular na presença de materiais poliméricos em contato com dentina bovina hígida**. 76f. Tese de Doutorado em Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2017.

Os materiais poliméricos atualmente são muito utilizados em odontologia por terem várias vantagens sobre outros materiais de restauração no entanto, tem-se demonstrando a citotoxicidade dos compostos lixivados após sua polimerização. Assim o objetivo desta tese foi investigar a viabilidade celular dos queratinócitos quando em contato com diferentes tipos de materiais poliméricos restauradores na presença de dentina. Com o propósito de simular diferentes condições clínicas, foram confeccionadas diversas restaurações diretas e indiretas sobre discos de dentina bovina hígida. Iguais procedimentos foram realizados sobre placas de vidro até completar no total 14 grupos experimentais. O grau de conversão de cada um dos materiais foi avaliado. Clinicamente é provável que restaurações usando materiais poliméricos não exerçam considerável agressividade às células gengivais (HaCaT) uma vez que a dentina atua como fator protetor. Os seguintes materiais foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes: OptiBond FL® (OB), Single Bond Universal® (SBU), Clearfil SE® (CSE), Dyad Flow® (DF), Filtek Z350XT® (Z350), Filtek Z350XT® Flow (FF), Dyad Flow® (DF), Variolink II® (VLII) and Rely U200® (U200). Foram testados três corpos-de-prova para cada grupo de materiais restauradores poliméricos (n=84). Os eludatos das restaurações foram obtidos da incubação das amostras após 1 e 7 dias em cultura celular à 37°C. Células HaCaT foram expostas aos eludatos durante 24 horas e 7 dias e posteriormente realizado o teste de viabilidade com MTT. As provas estatísticas para viabilidade celular mostraram que após o 1º dia o fator material e a interação entre fatores foram ambos significantes ($p<0.001$) sendo que a presença da dentina foi também um fator significativo ($p=0.023$). Após 7 dias, ambos os fatores e sua interação foram significantes ($p<0.001$). As análises estatísticas para intervalo de confiança de 95% mostrou que não houve diferenças entre CSE e OB, entre DF, FF e U200, e entre SBU e Z350. Clinicamente, é provável que restaurações utilizando materiais poliméricos não exerçam considerável agressão às células gengivais HaCat.

Palavras-chave: citotoxicidade; materiais poliméricos; resinas compostas; cimentos resinosos; adesivos dentários; materiais autoadesivos, grau de conversão.

Abstract

CARRILLO COTTO, Ricardo Alfredo. **Cell behavior in the presence of polymeric materials in contact with sound bovine dentin**. 76f. Thesis of PhD in Dentistry – Graduate Program in Dentistry. Federal University of Pelotas. Pelotas, 2017.

Polymeric materials are currently widely used in dentistry because they have several advantages over other restorative materials however the cytotoxicity of the leached compounds has been demonstrated after their polymerization. Thus the aim of this thesis was to first investigate the cellular viability of keratinocytes when in contact with different types of restorative polymeric materials in the presence of dentin. The degree of conversion of each of the materials was also evaluated. Clinically is probably that restorations using polymeric materials do not exert considerable aggression to gingival (HaCaT) cells due dentin acts like a protection factor. In order to simulate different clinical conditions, different direct and indirect restorations were performed on dentin bovine disks. Same restorative procedures were performed on glass plates to obtain a total of 14 experimental groups. The following materials were used according to the manufacturers' instructions: OptiBond FL® (OB), Single Bond Universal® (SBU), Clearfil SE® (CSE), Dyad Flow® (DF), Filtek Z350XT® (Z350), Filtek Z350XT® Flow (FF), Dyad Flow® (DF), Variolink II® (VLII) and Rely U200® (U200). Three specimens for each polymeric restorative materials group were tested (n=84). Restoration extracts were obtained from 1 and 7 days incubation of specimens in cell culture at 37°C. HaCaT keratinocytes were exposed to the extracts for 24h and 7 days and viability was assessed using the MTT assay. Statistics for cell viability after day 1 showed that the factor material and the interaction between factors were both significant ($p < 0.001$) and the presence of dentin was also a significant factor ($p = 0.023$). At day 7, both factors and their interaction were significant ($p < 0.001$). Statistical analyses by 95% confidence interval showed that there was not difference between CSE and OB, among DF, FF and U200, between SBU and Z350. Clinically is probably that restorations using polymeric materials do not exert considerable aggression to gingival (HaCaT) cells.

Key-words: cytotoxicity; polymeric materials; composites resins; resin cements; dental adhesives; self-adhesive materials, degree of conversion.

Lista de figuras

Projeto

Figura 1 Exemplo dos 19 distintos grupos de restaurações (sem contato com dentina).....	25
Figura 2 Camadas dos diferentes substratos: dentina, adesivo e resina composta.	26
Figura 3 Camadas dos diferentes substratos: dentina, adesivo, cimento e resina composta	26
Figura 4 Camadas dos diferentes substratos: dentina e resina composta autoadesiva	26
Figura 5 Camadas dos diferentes substratos: dentina, cimento autoadesivo e resina composta.	27

Artigo

Figura 1 Means + standard deviations for cell viability at day 1. Differences between groups are indicated by uppercase letters (no dentin groups) and lowercase letters (dentin groups). Lines above bars connect groups that were statistically similar for the presence of dentin or not ($p < 0.05$).....	64
Figura 2 Means + standard deviations for cell viability at day 7. Differences between groups are indicated by uppercase letters (no dentin groups) and lowercase letters (dentin groups). Lines above bars connect groups that were statistically similar for the presence of dentin or not ($p < 0.05$).....	65

Lista de tabelas

Projeto

Tabela 1. Materiais poliméricos testados	27
Tabela 2. Combinação dos grupos de materiais poliméricos testados	28
Tabela 3 Componentes resinosos de cada um dos materiais utilizados no estudo...	28-29
Tabela 4. Orçamento previsto para viabilização do projeto.....	32
Tabela 5 Cronograma de execução do projeto.	33

Artigo

Table 1. Composition of the materials evaluated in this study.....	59-62
Table 2. Groups and combinations of materials tested. In left column is showed the groups that were in non-contact with dentin (NCD). In middle column is showed groups were in contact with dentin (CD). In right column is showed all different dental materials combinations.....	62
Table 3. Results for degree of C=C conversion, %.....	63

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	por cento
°C	graus Celsius
µm	Micrômetro
10-MDP	10 Metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato
Z350	Filtek Z350 XT ® (3M ESPE)
Bis-EMA	Bisfenol A diglicidil metacrilato
CP	Cement-Post® (Angelus)
CSE	Clearfil SE Bond® (Kuraray)
DF	Dyad Flow® (Kerr)
EDMA	Etilenglicol dimetacrilato
ED	Empress Direct®
et al.	E outros
GPDM	Ácido glicerofosfórico dimetacrilato
HEMA	2-Hidroxietil metacrilato
LED	Diodo emissor de luz
mg/ml	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mW	Miliwatts
nm	Nanômetro
OB	OptiBond FL® (Kerr)
PEGDMA	Polietilenglicol dimetacrilato
RX	RelyX ARC® (3M ESPE)
SBU	Single Bond Universal® (3M ESPE)
TEGDMA	Trietilenglicol dimetacrilato
U200	U200 RelyX® (3M ESPE)
UDMA	Dimetacrilato de uretano
HaCat	Queratinócitos

Sumário

1 Introdução	144
2 Projeto de pesquisa.....	15
3 Relatório do trabalho de campo	41
4 Artigo	42
6 Considerações finais.....	66
Referências	67
Apêndices.....	75

1 Introdução

Nos últimos anos, o desenvolvimento dos materiais poliméricos levou à confecção de restaurações cada vez mais duráveis e estéticas. Embora tenha-se obtido considerável melhoria nas propriedades físico-mecânicas dos materiais, o sucesso clínico depende da sua compatibilidade com os tecidos. Nesse sentido, o sucesso biológico de um material depende de, além do desempenho funcional, não causar prejuízo aos tecidos e de modular positivamente a resposta do organismo.

Sabe-se que os materiais poliméricos restauradores dentários em geral, são citotóxicos em maior ou menor grau. A citotoxicidade deste tipo de materiais é principalmente determinada pela quantidade e pela natureza dos componentes orgânicos que são liberados na boca ou na polpa devido a uma incompleta polimerização ou à degradação que o material sofre ao longo do tempo. Assim, publicações de inúmeros artigos decorrentes de pesquisas, nas quais foi testada a citotoxicidade *in vitro* dos distintos materiais poliméricos restauradores, tanto comerciais quanto experimentais, e na grande maioria dos casos, os resultados têm demonstrado a citotoxicidade destes.

A maioria dos trabalhos que avaliam a citotoxicidade de materiais restauradores, utiliza-os de maneira isolada ou não, utilizando os eludatos desses materiais em contato com diferentes linhagens celulares. Outros já os agruparam e reproduziram modelos de restaurações testando-os em condições semelhantes. Embora sabe-se também que a dentina age como um agente tampão, há poucos estudos que tenham avaliado o efeito protetor da dentina na citotoxicidade de materiais restauradores. Nesse contexto, o objetivo foi simular as condições clínicas nas quais restaurações com elementos resinosos estivessem em contato com dentina e, dessa forma, tentar reproduzir a resposta celular dos queratinócitos da gengiva humana.

Assim, o presente estudo objetiva investigar o comportamento celular (dos queratinócitos) quando em contato com restaurações dentárias poliméricas confeccionadas sobre dentina.

2 Projeto de pesquisa

2.1 Introdução

A utilização das resinas compostas tem se tornado cada dia mais comum na prática odontológica em virtude da demanda dos pacientes por restaurações que simulen as cores naturais dos dentes. (DARMANI et al., 2009). Em grande parte esta demanda foi possível devido à mudança nos sistemas adesivos, a qual consiste de dois substratos unidos. Em odontologia, o aderente é o substrato (esmalte, dentina e raramente o cimento) ao qual o adesivo é aplicado (PERDIGÃO, 2007). A adesão às estruturas de esmalte e dentina possibilitou a execução de preparos mais conservadores, com mínimos desgastes dentários, permitindo uma abordagem restauradora minimamente invasiva (ANUSAVICE, 2005).

As resinas compostas em odontologia são utilizadas como materiais restauradores em dentes anteriores e posteriores. Além disto, são utilizadas como selantes de fósulas e fissuras e como materiais para cimentação de *inlays*, coroas, facetas e *brackets* ortodônticos (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009, DARMANI et al., 2009). Os materiais restauradores adesivos têm sua dureza aumentada, quando são polimerizados e, a polimerização ocorre por meio de reações químicas pelas quais a macromolécula ou polímero é formado a partir de várias moléculas conhecidas como monômeros. A polimerização de monômeros metacrilatos produz polímeros reticulados, os quais são aplicados em larga escala na odontologia restauradora adesiva, como em resinas compostas, sistemas adesivos, cimentos adesivos e selantes de fósulas e fissuras (ANUSAVICE, 2005).

Um compósito resinoso tipicamente utilizado consiste em uma matriz orgânica, na qual estão inseridas partículas inorgânicas, sendo os componentes orgânicos mais comumente usados o HEMA, o Bis-GMA, o TEGDMA e o UDMA (OGLIARI et al., 2008). A matriz das resinas compostas está constituída principalmente por Bis-GMA ou por UDMA, mas com o propósito de diminuir sua viscosidade, foram introduzidos os monômeros diluentes como o TEGDMA. Os componentes passam do estado viscoso ao sólido (rígido) pela ativação química ou por luz visível (ROMAGUERA et al. (A), 2009).

A polimerização das resinas compostas pode ocorrer quimicamente ou mais frequentemente na atualidade, através da fotoativação. O número de ligações duplas

que são abertas durante este processo e sua participação na polimerização é chamado de índice de conversão, o qual varia de 35% a 77%. A incompleta polimerização pode ocorrer em decorrência da presença de oxigênio em contato com a superfície da resina, qualidade, intensidade e distância da fonte luz. (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009).

Como consequência, o aumento da solubilidade da camada superficial vai influenciar as propriedades biológicas do material. Os monômeros residuais são aqueles componentes liberados da resina dentro de vários meios de extração e, o conteúdo residual de monômero no cultivo celular pode ser diferente no seu índice de conversão (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009).

Os meios de extração podem ser hidrofílicos como solução salina fisiológica, meios hidrófobos como etanol, ou meios mistos com 75% de etanol e 25% de água. Existe uma correlação entre o meio de extração e o índice de conversão, especialmente entre TEGDMA e Bis-GMA e o meio aquoso. Aproximadamente um décimo dos grupos metacrilatos produzem monômeros residuais. Em consequência disso, a exposição aos materiais dentários pode causar sensibilização imunológica e, assim, o contato com uma resina composta pode desenvolver uma reação alérgica (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009).

A reação de polimerização das resinas compostas pode permanecer incompleta por tempo indefinido, logo, moléculas de monômero livre de trietileno glicol metacrilato (TEGDMA) ou 2-hidroxi-etil-metacrilato (HEMA) podem ser diretamente responsáveis pelas reações de citotoxicidade e hipersensibilidade ocasionadas por este material. Tais reações produzem quadros clínicos como dermatites e/ou mucosites, os quais são produzidos pelos aditivos, pelos pré-polímeros e pelos monômeros, principalmente por aqueles de baixo peso molecular (ROMAGUERA et al. (A), 2009, MOHARAMZADEH et al., 2009, ANDERSSON & DAHLGREN, 2010).

A penetração do antígeno via epiderme e mucosa bucal ocorre pela captação através das células de Langerhans e células dendríticas apresentando o alérgeno aos Linfócitos Tais células se multiplicam e defendem o organismo perante os novos contatos com o alérgeno. (VILAPLANA et al., 2009, BRUJINZEEL-KOOMEN et al., 1989).

2.2 Proposição

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade em cultivo celular e grau de conversão de distintos materiais poliméricos.

2.2.2 Objetivos específicos

2.2.2.1 Estabelecer uma metodologia de avaliação de atividade citotóxica de materiais aplicados ao substrato no qual são utilizados.

2.2.2.2 Testar o grau de citotoxicidade de distintas formulações de materiais poliméricos comerciais utilizados.

2.3 Revisão de Literatura

RESINAS COMPOSTAS.

A quantidade de substâncias que são liberadas, depende do meio de extração. TEGDMA, um monômero comumente usado em resinas compostas atuais possui fácil extração em meio aquoso (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009, FURCHE et. al., 2013).

Os compósitos podem ser citotóxicos antes e imediatamente após a ativação da reação de polimerização. (SCHMALZ & ARENHOLT-BINDSLEV, 2009).

A mucosa bucal é uma barreira permeável para os materiais odontológicos restauradores, os quais podem causar dano mitótico às células da camada basal do epitélio e, após a divisão celular é detectada uma instabilidade genômica nas células que migram à superfície do epitélio bucal (VISALLI, et. al., 2013).

Assim, a citotoxicidade depende igualmente do grau de polimerização ou índice de conversão. Isto foi concluído em um estudo, no qual se utilizou ativação com lâmpada halógena e calor, e exibiu resultados em que espécimes foram significativamente mais tóxicos após tempo curto de ativação (15 segundos),

comparados com aqueles expostos a tempos mais longos (30 e 60 segundos) (CAUGHMAN et al., 1991).

O propósito deste estudo será utilizar um ensaio *in vitro* para avaliarmos os adesivos, os cimentos resinosos e as resinas compostas ativadas com lâmpada LED, estas últimas tratadas em sua superfície.

O grau de conversão das resinas compostas é um fator que influencia consideravelmente suas propriedades físicas e estruturais. Em geral, quanto maior o número de duplas ligações consumidas, maior será sua resistência mecânica. As duplas ligações sem reagir podem, todavia estar presentes no monômero livre ou nos grupos soltos na cadeia. O monômero sem reagir pode ser lixivado do material polimérico e assim causar irritação dos tecidos moles (SIDERIDOU et al., 2001), além de ser citotóxico (SIGUSCH et. al, 2007), tendo-se demonstrado que o TEGDMA é mais citotóxico do que o HEMA (BECHER et. al., 2006, URCAN et. al., 2010).

A citotoxicidade aumenta enquanto as cores de resina forem mais escuras e varia também de acordo com o aparelho utilizado para fotopolimerizar (SIGUSCH et. al., 2012). DURNER et. al., em 2012, demonstraram que existe uma correlação inversa entre o grau de conversão e as substâncias lixivadas das resinas compostas.

Vários tipos de materiais dentários restauradores são utilizados para restauração dentária. Quando esses materiais ficam em contato direto com os tecidos dentários, periodonto, mucosa bucal e fluidos corporais, a dissolução dos componentes desses materiais na boca, torna-se de interesse clínico (DARMANI et al., 2007).

Todos os materiais poliméricos liberam componentes no meio bucal, os quais são diluídos sistemicamente e podem causar efeitos adversos. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os compósitos baseados em resinas dentais e seus componentes têm efeitos citotóxicos, genotóxicos ou mutagênicos. Relatam também que os monômeros representam de 20% a 40% em peso da matriz orgânica de uma resina composta e isso representa um grande risco de biotoxicidade após sua absorção (DARMANI et al., 2007, LIBONATI et al., 2011, REICHEL et al., 2010, URCAN et. al., 2010, SCHWEIKL et. al., 2005), e outros *in vivo* (ANZILIERO et. al., 2010, VISALLI, et. al., 2013, KLEINSASSER, et. al., 2004, SZEPE et. al., 2002, TU, et. al., 2009). VAN LANDUYT et. al., em 2011,

A biocompatibilidade tem relação com alguns fatores, particularmente com a quantidade e natureza dos componentes lixiváveis e a estrutura da superfície da restauração final (KARAOGLANOGLU et. al., 2010). AUSIELLO et. al, em 2013, demonstraram que a citotoxicidade dos materiais poliméricos depende mais do conteúdo da matriz orgânica do que o conteúdo da carga inorgânica.

Outro estudo demonstrou que apesar de varios monômeros serem lixivados das resinas compostas, estas quantidades não seriam tóxicas para o organismo humano (SEISS, et. al., 2009).

Novos materiais restauradores poliméricos foram desenvolvidos sendo de grande importância testar *in vitro* o que aconteceria na boca dos pacientes visando a continuidade da utilização destes materiais ou recomendando o desenvolvimento de outros que não somente melhorem suas características mecânicas, mas também a compatibilidade com os tecidos moles da boca (SCHWEIKL, et. al., 2005, VISALLI, et. al., 2013).

ADESIVOS.

BLASIAK et. al., 2012, demonstraram o potencial genotóxico dos adesivos dentais quando em combinações tais como HEMA/Bis-GMA. Ou quando utilizados compostos como Bis-GMA, de acordo a SARAFIAN, et. al., 2008.

Outro estudo realizado *in vitro* por KOULAOUZIDOU et. al. em 2007, demonstrou que o adesivo experimental anti-bacteriano auto-condicionante testado tem menos efeito citotóxico na polpa dental que aqueles sem esta propriedade. Por outra parte, KORSUWANNAWONG et. al., em 2012 demonstraram que três adesivos auto-condicionantes também não foram citotóxicos à polpa dental quando testados *in vitro*.

DURNER et. al. em 2012 demonstraram que os eludatos das misturas binárias entre monômeros básicos e co-monômeros têm uma interação sinérgica tóxica maior sobre os fibroblastos gengivais humanos do que os eludatos dos co-monômeros puros.

Os estudos de toxicidade *in vitro* refletem melhor as condições clínicas dos dentes restaurados quando os métodos experimentais avaliam o fenômeno de liberação da superfície dos materiais restauradores polimerizados. Além disso, a

toxicidade pode mudar radicalmente quando é analisado o efeito de um componente separado (FANO et. al., 2007).

É interessante observar que segundo MAEDA et. al., em 2008, a dentina apresenta uma forte capacidade tampão contra a acidez dos *primers* auto-condicionantes. Na presença de hidroxiapatita a fotopolimerização dos adesivos auto-condicionantes teve uma significativa melhora (ZHANG et.al. (A), 2012) e em especial, uma dramática melhora no grau de conversão destes adesivos quando em contato com dentina (ZHANG et. al. (B), 2012).

FRANZ et. al., em 2009, demonstraram que simulando as condições da inserção de materiais poliméricos em boca, os adesivos não mostraram mais citotoxicidade que a das resinas.

RESINAS COMPOSTAS, CIMENTOS E ADESIVOS.

SCHEDLE et al., demonstraram em 1998 que os cimentos resinosos, os adesivos e as resinas compostas foram citotóxicos para os fibroblastos L929 após a fotopolimerização, com tempo padronizado para todos os materiais, com luz halógena.

RESINAS COMPOSTAS E ADESIVOS.

Outro estudo foi feito primeiramente comparando a toxicidade de distintas marcas comerciais de resinas compostas, isoladas e não isoladas do oxigênio e, fotopolimerizadas durante 40 segundos, Compararam a citotoxicidade da combinação de adesivos em uma e duas camadas e fotopolimerizadas de acordo com as instruções do fabricante, sendo no fundo e resina composta sobre o adesivo, polimerizada esta última durante 40 segundos com e sem isolamento do oxigênio para, segundo FRANZ et al., em 2009, simular as condições reais do que acontece dentro da boca.

CIMENTOS.

ULKER E SENGUN, em 2009 concluíram que todos os cimentos resinosos auto-condicionantes testados em células pulpares bovinas foram citotóxicos. Já em

2012, ULKER et. al., demonstraram que cimentos resinosos convencionais foram citotóxicos tanto para células pulpare humanas quanto para bovinas.

Em 2010, ERGUN et. al., em um estudo laboratorial, demonstraram que mesmo utilizando lâmpadas LED, a diminuição no tempo de ativação dos cimentos testados levou a uma maior citotoxicidade em fibroblastos L929.

KONG et. al., em 2009, concluíram que a citotoxicidade em células pulpare humanas depende do tipo de cimento resinoso utilizado, e da concentração do médio para obter os eludatos.

SAHABI et. al., em 2011, testaram 2 cimentos resinosos e um cimento de fosfato de zinco em fibroblastos L929, nesse estudo demonstraram que todos os cimentos foram citotóxicos, sendo que aquele de fosfato de zinco apresentou a maior citotoxixidade.

MALKOC et. al., em 2009 relataram que dos cimentos resinosos ortodôncicos fotoativados quando testados em contato com fibroblastos L929, um deles apresentou citotoxicidade aumentada enquanto os outros mostraram uma menor citotoxicidade.

CIMENTOS E ADESIVOS.

Em 2009, SCHMID et. al., observaram que os cimentos resinosos convencionais mostraram menor citotoxicidade do que aqueles auto-adesivos e quimio-ativados. Os adesivos aumentaram apenas a citotoxicidade dos cimentos resinosos. Os cimentos convencionais e auto-adesivos de ativação dual foram menos citotóxicos do que aqueles quimio-ativados.

2.4 Materiais e métodos

Serão utilizadas 3 diferentes marcas comerciais de resinas compostas, Empress Direct® (Ivoclar Vivadent), Dyad Flow® (Kerr) e Filtek Z350 XT® (3M ESPE), 3 diferentes marcas comerciais de adesivos, OptiBond FL® (Kerr), Adper Single Bond Universal® (3M ESPE), Clearfil SE Bond® (Kuraray), 3 diferentes marcas comerciais de cimentos resinosos, Rely X ARC® (3M ESPE), U 200 Rely X® (3M ESPE), Cement-Post® (Angelus).

Espécimes serão confeccionados sobre discos de dentina bovina de dentes hígidos recentemente extraídos e com dimensões padronizadas (5mm x 2,3mm). Os dentes serão previamente mantidos em Cloramina T para sua desinfecção durante 7 dias. Esses blocos serão lixados com lixa de carbeto de silício de granulação 80 e, após com lixa de granulação 600 em máquina Politriz sob irrigação, com velocidade de 100 rpm e esterilizados com raios gama. Os blocos serão dispostos assim: utilizando uma matriz de silicone de adição com uma luz de diâmetro igual aos blocos de dentina, nas quais serão colocados cada um dos blocos de dentina no fundo e, serão condicionados ou não, para que logo sejam construídas restaurações utilizando adesivos, e resina composta ou cimentos, sobre dentina. Nos grupos 1-3 serão colocados uma combinação de 1) SBU + ED, 2) CSE + ED, 3) OB + ED; nos grupos 4-6 serão colocados uma combinação de 4) SBU + 350, 5) CSE + 350, 6) OB + 350; no grupo 7 será colocada 7) DF; nos grupos 8-10, 8) SBU + RX + ED, 9) CSE + RX + ED, 10) OB + RX + ED; nos grupos 11-13, 11) SBU + RX + 350, 12) CSE + RX + 350, 13) OB + RX + 350; nos grupos 14-17, 14) CSE + CP + ED, 15) OB + CP + ED, 16) CSE + CP + 350, 17) OB + CP + 350; nos grupos 18-19, 18) U200 + ED, 19) U200 + 350. Todos os grupos de resinas compostas, serão confeccionados e fotoativados com fotopolimerizador tipo LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) pelo tempo indicado pelo fabricante.

Protocolos de aplicação dos materiais poliméricos

OptiBond FL® (KERR): Adesivo convencional de 3 passos

- Codicionamento ácido por 15 s
- Lavagem por 15 s
- Secagem por 3 s
- Aplicação do primer por 15 s
- Secagem por 5 s
- Aplicação do adesivo por 15 s
- Secagem por 5 s
- Fotoativação por 20 s

Clearfil SE Bond® (KURARAY): Adesivo autocondicionante de 2 passos

- Aplicação do primer

- Deixar por 20 s
- Secar com jato de ar suave
- Aplicação do adesivo e distribuí-lo com jato suave de ar
- Fotoativação por 10 s

Single Bond Universal® (3M ESPE): Adesivo autocondicionante de passo único

- Aplicação do adesivo por 20 s
- Secagem por 5 s
- Fotoativação por 10 s

Filtek Z350 XT® (3M ESPE):

- Fotoativação por 20 s

IPS Empress Direct® (IVOCLAR VIVADENT):

- Fotoativação por 20 s

Dyad Flow® (KERR): Resina composta autocondicionante

- Aplicação por 20 s
- Fotoativação por 20 s

Rely X ARC® (3M ESPE): Cimento resinoso dual convencional

- Condicionamento ácido
- Adesivo
- Fotoativação por 40 s

U 200® (3M ESPE): Cimento resinoso dual autocondicionante

- Fotoativação por 20 s

Cement-Post® (ANGELUS): Cimento resinoso quimiopolimerizável

- Condicionamento ácido
- Adesivo
- Polimerização química por 6 min

Utilizarão-se 5 corpos de prova para o experimento de citotoxicidade e 5 corpos de prova para o experimento de grau de conversão em cada um dos 19 grupos ou conjuntos de materiais poliméricos, totalizando 190 corpos de prova.



Fig. 1 Exemplo dos 19 distintos grupos de restaurações (sem contato com dentina).

SBU= Single Bond Universal®, CSE= Clearfil SE Bond®, OB= OptiBond FL®,
 ED= Empress Direct®, 350= Filtek Z350 XT®, DF= Dyad Flow®,
 RX= Rely X ARC®, CP=Cement-Post®, U200=U 200 Rely X®

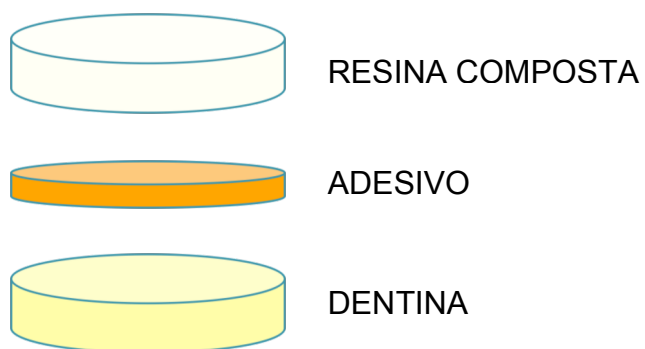


Fig. 2 Camadas dos diferentes substratos: dentina, adesivo e resina composta.

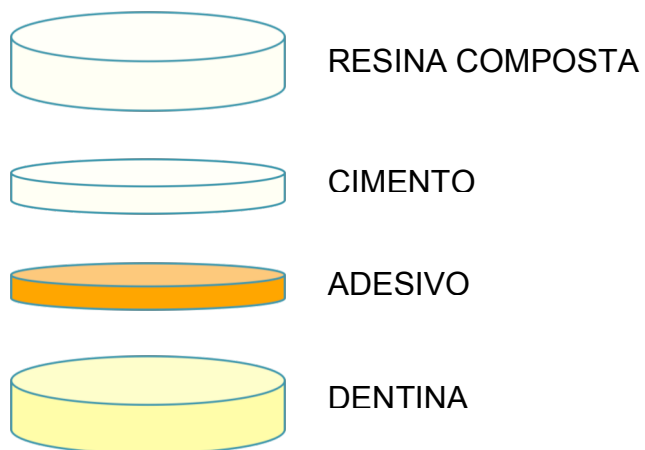


Fig. 3 Camadas dos diferentes substratos: dentina, adesivo, cimento e resina composta

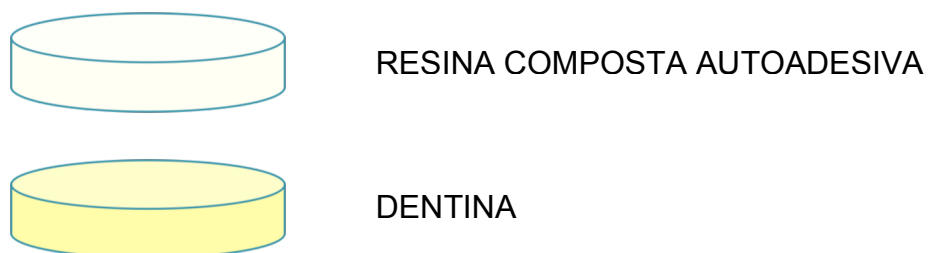


Fig. 4 Camadas dos diferentes substratos: dentina e resina composta autoadesiva

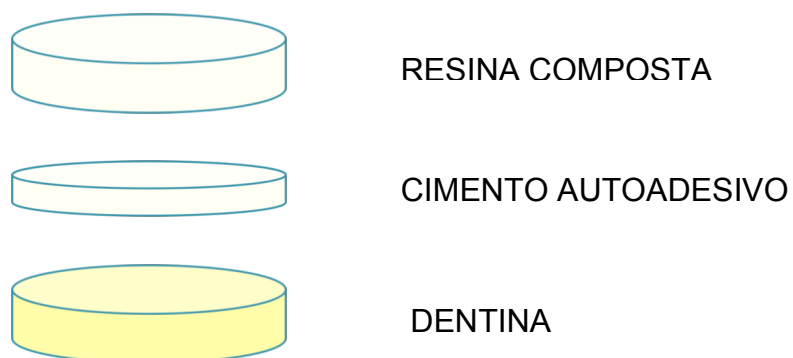


Fig. 5 Camadas dos diferentes substratos: dentina, cimento autoadesivo e resina composta.

Tabela 1. Materiais poliméricos que serão testados

Material	Marca Comercial	Fabricante	Características	Tempo de fotoativação (s)
Resina	Empress Direct	Ivoclar Vivadent	Cor EA1	20
Resina	Filtek Z350 XT	3M ESPE	Cor A1E	20
Resina	Dyad Flow	Kerr	Cor A1	20
Adesivo	OptiBond FL	Kerr	Convencional de três passos	20
Adesivo	Adper Single Bond Universal	3M ESPE	Autoadesivo de um passo	10
Adesivo	Clearfil SE Bond	Kuraray	Autoadesivo de dois passos	10
Cimento	U 200 Rely X	3M ESPE	Dual autoadesivo	20
Cimento	Rely X ARC	3M ESPE	Dual convencional	40
Cimento	Cement-Post	Angelus	Química, convencional	180

Tabela 2. Combinação dos grupos de materiais poliméricos que serão testados

Grupo	Adesivo	Resina	Cor	Cimento
1, 2, 3	Single Bond			
	Universal – Clearfil	Empress Direct	EA1	-
	SE – OptiBond FL			
4, 5, 6	Single Bond			
	Universal – Clearfil	Filtek Z350	A1E	-
	SE – OptiBond FL			
7	-	Dyad Flow	A1	-
8, 9, 10 / 11, 12, 13	Single Bond	Empress		
	Universal – Clearfil	Direct/Filtek	EA1/A1E	Rely X ARC
	SE – OptiBond FL	Z350		
Grupo 14, 15/16,17	Clearfil SE –	Empress		
	OptiBond FL	Direct/Filtek	EA1/A1E	Cement-Post
		Z350		
Grupos 18/ 19		Empress		
	-	Direct/Filtek	E1A/A1E	U 200 Rely X
		Z350		

Tabela 3 Componentes resinosos de cada um dos materiais que serão utilizados no estudo

Marca	Fabricante	Componentes
Empress Direct	Ivoclar Vivadent	A matriz de monômero compõe-se de dimetacrilatos (20-21,5% em peso, cor opalescente 17% em peso). A carga contém vidro de bário, tri-fluoreto de itérbio, óxidos mistos, dióxido de silício e copolímeros (77,5-79% em peso, cor opalescente 83% em peso). Componentes adicionais: aditivos, catalizadores, estabilizadores e pigmentos (<1,0% em peso). O conteúdo total de carga inorgânica é de 75-79% em peso ou 52-59% em volume (cor opalescente 60,5% em peso o 45% em volume). O tamanho de partícula da carga inorgânica oscila entre 40 nm e 3000 nm com um tamanho de partícula principal de 550 nm.
Dyad Flow	Kerr	Ácido glicerofosfórico dimetacrilato (GPDM) , monômeros de éster metacrilato, carga de minerais inertes, Fluoreto de Itérbio, ativadores, estabilizadores e corantes.

Filtek Z350 XT	3M ESPE	O sistema é ligeiramente modificado comparado à resina original Filtek™ Z250 Universal Restorative e a Filtek™ Supreme Universal restorative. A resina contém bis-GMA, UDMA, TEGDMA e bis-EMA (6). Para reduzir a contração, o monômero PEGDMA foi substituído por uma porção de TEGDMA na resina Filtek Supreme XT.
OptiBond FL	Kerr	Primer: Ester de metacrilato Adesivo: Monômeros: Dimetacrilato de trietilenglicol, Trifluoreto de Itérbio
Adper Single Bond Universal	3M ESPE	HEMA, Bis-GMA, Grupo de ésteres fosfóricos de metacrilato, 1,6 dimetacrilato hexanediol, ácido polialquênico metacrilato funcional (Vitrebond Copolymer), carga de sílica aderida finamente espalhada com 7-nm de tamanho de partícula primária, etanol, água, iniciadores baseados em canforoquinona, estabilizadores
Clearfil SE Bond	Kuraray	Primer: 10-MDP, HEMA, água. Adesivo: TEGDMA, UDMA, GPDM, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbico, sílica coloidal.
U 200 Rely X	3M ESPE	2-ácido propenóico, éster 2-metil-, 1,1'-[1-(hidroximetil)-1,2-etanedi]. Produtos reagentes com 2-hidroxi-1,3-propanedi dimetacrilato e óxido fosforoso. Trietilen glicol dimetacrilato (TEGDMA), sílica de sódio tratada com silano. Pó de persulfeto de vidro, Tert-butil-peroxi-3,5,5-trimetilhexanoeto.
Rely X ARC	3M ESPE	Pasta A Bis-GMA, TEGDMA, zircônia sílica, pigmentos, amina sistema fotoiniciador. Pasta B Bis-GMA, TEGDMA, zircônia sílica, peróxido de benzoíla. Cerâmica tratada com silano, Trietilen glicol dimetacrilato (TEGDMA), Bisfenol A diglicidil éter metacrilato (BISGMA), Sílica tratada com silano, Polímero dimetacrilato funcional, Trifenilantimônio.
Cement-Post	Angelus	Pasta base (2,5 g): Bis-GMA, TEGDMA, cerâmica de vidro de bário, sílica pirogênica, amina terciária, antioxidante, pigmentos. Pasta catalisadora (2,5 g): Bis-GMA, TEGDMA, cerâmica de vidro de bário, sílica pirogênica, ativador, estabilizantes.

TESTE DE CITOTOXICIDADE

Corpos-de-prova serão esterilizados, por 2 horas cada superfície, em raios gamma sendo que cada espécime será armazenado em 1ml de DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dubelco), por 24hs, à 37°C, para a confecção dos eludatos. A seguir serão removidos e o meio condicionado pelas resinas compostas será congelado em freezer -80°C, até o seu uso. Para os ensaios de citotoxicidade das diferentes resinas estudadas será usada uma linhagem celular imortalizada de queratinócitos (HaCaT – doação do Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr., PG em Patologia Bucal, FO/USP/SP). A garrafa de cultivo contendo os queratinócitos será colocada em estufa de 5% CO₂ à 37°C por um período de 3 horas para promover a adesão celular no fundo da mesma. Novo meio de cultura (DMEM, completo) será adicionado à linhagem celular e esta permanecerá em atmosfera 5% CO₂, à 37°C, até obter-se a confluência de aproximadamente 70% da superfície cultivável da garrafa. Cada procedimento de subcultura originará uma nova passagem da linhagem celular.

A suspensão das células será plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em placas de cultivo celular (ELISA/ Techno Plastic Products) de 96 poços. Cada poço receberá 200µl de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de antibiótico. As placas serão então incubadas à 37°C a 5% CO₂ (Thermo Electron Corporation) por 24 horas para promover a adesão celular ao fundo dos poços.

Passados os tempos detalhados acima, serão retirados com pipeta multicanal os 200µl do meio de cultura de cada poço e adicionados 200µl/poço dos diferentes eludatos. As substâncias ficarão em contato com as células pelo período de 24 horas. Nos poços controles, serão adicionados 200 µl de DMEM com a mesma quantidade de células e seu meio de cultura, trocado após as primeiras 24 horas. Poços com DMEM sem a adição de monômeros e sem adição de células serão usados como controles brancos. Após 24 horas será feito a remoção dos eludatos-teste e adicionados 20µl de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio] (Sigma/Aldrich) diluídos em 180 µl de DMEM em cada poço (5 mg/ml MTT). As placas serão então incubadas em ambiente sem luminosidade por 4 horas à 37°C em atmosfera com 5% CO₂ (Thermo Electron Corporation). Após este

período, a solução contendo MTT diluído em DMEM será aspirada e solubilizada com 200µl de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth).

As placas serão levadas a uma mesa agitadora (Biomixer/ TS-2000A UDRL Shaker) a uma velocidade de 150 rpm por 10 minutos para a solubilização dos cristais de Formazan produzidos pela redução do MTT pela desidrogenasesuccínica da respiração celular. Subsequentemente, a absorbância será medida usando um espectrofotômetro (Termoplate/TP-Reader) em um comprimento de onda de 540nm.

Será aplicada a prova estatística apropriada.

Grau de conversão

O grau de conversão dos materiais poliméricos será avaliado por meio de aparelho espectrofotômetro infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR Shimadzu Prestige21 Spectrometer, Shimadzu, Tóquio Japão) equipado com dispositivo de refletância total atenuada (ATR), composto por um cristal horizontal de seleneto de zinco (ZnSe), com espelhos de angulação de 45° (PIKE Technologies, EUA). Um suporte será acoplado para a fixação da unidade foto-ativadora LED (Radii® Curing Light, SDI, Bayswater, Victória, Austrália) ao espectrofotômetro, permitindo uma distância uniforme de 5mm entre a extremidade da ponteira de fibra ótica e a amostra. A irradiância será mensurada por intermédio de radiômetro portátil (model 100, Kerr, EUA).

Cada amostra será vertida diretamente no cristal de ZnSe em pequenas gotas e/ou dose (volumes padronizados) e fotoativada pelos tempos indicados na tabela 1. Cada material polimérico será analisado três vezes. Para o monitoramento de varredura será utilizado o software IRSolution, em uma faixa espectral entre 1750 e 1550cm⁻¹, com resolução de 8 cm⁻¹ e velocidade de deslocamento de espelho de 2,8mm/s. Com esta configuração, é possível obter um espectro por segundo durante a foto-ativação. A análise será realizada em ambiente com temperatura controlada de 23°C e umidade relativa de <60%.

O grau de conversão, por segundo, será calculado considerando a intensidade da vibração do tipo estiramento da dupla ligação carbono-carbono na frequência de 1635cm⁻¹.

O estiramento simétrico do anel aromático em 1610cm⁻¹ das amostras polimerizadas e não polimerizadas será utilizado como padrão interno.

Posteriormente, os dados obtidos serão plotados em uma curva ajustada pelo parâmetro regressivo não-linear de Hill 3.

2.5. Orçamento

Tabela 4. Orçamento previsto para viabilização do projeto.

Item	Quant	Unid	Descrição do material	P Unit R\$	P Total R\$
01	05	Pct	Frasco (garrafa) cultura celular 25cmÇ c/10 peças TPP	39,40	197,00
02	05	Pct	Frasco (garrafa) cultura celular 75cmÇ c/5 peças TPP	37,55	187,75
03	01	Fr	TRYP SIN 0.25% EDTA - INVITROGEN - 500ML 25200072	442,00	442,00
04	01	Fr	SORO FETAL BOVINO - INVITROGEN - 500 ML 12657029	476,00	476,00
05	01	Fr	PBS, PH 7.2, 10X - INVITROGEN - 500ML 70013032	351,90	351,90
06	01	Fr	DMEM - INVITROGEN - 10X1L 12100046	416,50	416,50
07	05	Pç	Pipeta sorológica desc. 10ml.	3,45	17,25
08	01	Fr	Reagente Bradford Sigma c/500ml.	432,00	432,00
09	02	Fr	BSA Sigma A2153 c/10gr.	372,80	372,80
10	10	Pç	Sistema de filtração a vácuo 0,22micras cap. 500ml. TPP	57,73	577,30
11	01	L	Dimetilsulfoxido (DMSO)	60,25	60,25
12	10	L	Água de destilada para injeção.	18,00	180,00
13	02		Empress Direct® (Ivoclar Vivadent)	150,00	300,00
14	08	Ser	Dyad Flow® (Kerr) 2g	100,00	800,00
15	02		Filtek Z350 XT® (3M ESPE)	00,00	00,00
16	01		OptiBond FL® (Kerr)	150,00	150,00
17	01		Adper Single Bond Universal® (3M ESPE)	00,00	00,00
18	01		Clearfil SE Bond® (Kuraray)	150,00	150,00
19	01		U200 Rely X® (3M ESPE)	00,00	00,00
20	01		Rely X ARC® (3M ESPE)	00,00	00,00
21	01		Cement-post® (Angelus)	113,00	113,00

TOTAL	5.223,75
-------	----------

2.6 Cronograma

Tabela 5 Cronograma de execução do projeto.

Mês/Ano	Revisão de literatura	Aquisição dos materiais	Análises do grau de conversão	Cultura de células/Análises <i>in vitro</i>	Análise dos dados	Redação final da tese	Redação dos artigos e submissão para publicação	Defesa
Mar-Dez/2013	X							
Jan-Fev/2014	X							
Mar./2014	X	X						
Abr./2014	X	X						
Mai./2014	X	X						
Jun./2014	X	X						
Jul./2014	X		X					
Ago./2014	X		X					
Set./2014	X		X					
Out./2014	X			X				
Nov./2014	X			X				
Dez./2014	X			X				
Jan./2015	X			X				
Fev./2015	X				X			
Mar./2015	X				X			
Abr./2015	X				X			
Mai./2015	X					X		
Jun./2015	X					X		
Jul./2015	X					X		
Ago./2015						X	X	
Set./2014							X	
Out./2014							X	
Nov./2015							X	

Dez./2015	X	
Jan/2016	X	
Fev/2016	X	
Mar/2016		X

2.7 Referências

ANDERSSON, J.; DAHLGREN. HEMA Enhances IgG! Production by human B-cells *in vitro*. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 89, p. 1461-64, 2010.

ANUSAVICE, K.J. Phillips Materiais Dentários. 11 Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005, 764p.

ANZILIERO, G.; DIHL, R.; LEHMANN, M.; REGULY, M.; RODRIGUES, H. Genetic toxicology of dental composite resin extracts in somatic cells in vivo. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, p. 625-9, 2010.

AUSIELLO, P.; CASSESE, A.; MIELE, C.; BEGUINOT, F.; GARCÍA, F.; DI JESO, B.; ULIANICH, L.; Cytotoxicity of dental resins composites: an in vitro evaluation. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 451-7, 2013.

BECHER, R.; KOPPERUD, H.; AL, R.; SAMUELSEN, J.; MORISBAK, E.; DAHLMAN, H.; LILLEAAS, E.; DAHL, J. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA, and two compomer extracts. **Dental Materials**, v. 22, p. 630-40, 2006.

BLASIAK, J.; SYNOWIEC, E.; TARNAWSKA, J.; CZARNY, P.; POPLAWSKI, T.; REITER, R. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 7487-96, 2012.

BRUJINZEEL-KOOMEN, C.; MUDDLE, G; BRUJINZEEL, P. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in atopic dermatites and their significance for its pathogenesis. **Allergic Immunologic**, Paris, v. 21, p.219-23, 1989.

CAUGHMAN, W.; CAUGHMAN, G.; SHIFLETT, R. Correlation of citotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. **Biomaterials**, London, v. 12, p.737-40, 1991.

DARMANI, H.; AL-HIYASAT, A.; MILHEM, M. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. **Quintessence International**, v. 38, n. 9, p. 789-95, 2007.

DURNER, J.; OBERMAIER, J.; DRAENERT, M.; ILIE, N. Correlation of the degree of conversion with the amount of elutable substances in nano-hybrid dental composites. **Dental Materials**, v. 28, p. 1146-53, 2012.

DURNER, J.; WELLNER, P.; HICKEL, R.; REICHL, F. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblast from dental monomers, **Dental Materials**, v. 28, p. 812-23, 2012.

ERGUN, G.; EGILMEZ, F.; YILMAZ, S. Effect of reduce exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power LED. **Journal of Appliance Oral Science**, v. 19, n. 3, p. 286-92, 2011.

FANO, V.; SHATEL, M.; TANZI, M. Release phenomena and toxicity in polymer-based dental restorative materials. **Acta Biomédica**, v. 78, p. 190-197, 2007.

FRANZ, A.; KÖNIG, F.; LUCAS, T.; WATTS, D.; SCHEDLE, A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree conversion. **Dental Materials**, v. 25, p. 232-39, 2009.

FURCHE, S.; HICKEL, R.; REICHL, F.; VAN LANDUYT, K.; SHEHATA, M.; DURNER, J. Quantification of elutable substances from methacrylate based sealers and their cytotoxicity effect on with human gingival fibroblasts. **Dental Materials**, v. 29, p. 618-25, 2013.

KARAOGLANOGLU, S.; AKGÜL, N.; ORÇUN, Y.; ÖZDABAK, N.; YILMAZ, S.; ÜNAL, L.; SEVEN, N. Cytotoxicity evaluation of seven different resin based restorative materials: in vitro study. **Materials Research Innovation**, v. 14, n. 3, p. 243-6, 2010.

KLIENSASSER, N.; WALLNER, B.; HARRÉUS, U.; KLEINJUNG, T.; FOLWACZNY, M.; HICKEL, R.; KEHE, K.; REICHL, F. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Journal of Dentistry**, v. 32, p. 229-34, 2004.

KONG, N.; JIANG, T.; ZHOU, Z.; FU, J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. **Dental Materials**, v. 25, p. 1371-5, 2009.

KORSUWANNAWONG, S.; SRICHAN, R.; VAJRABHAYA, L. Cytotoxicity evaluation of self-etching dentine bonding agents in a cell culture perfusion condition. **European Journal of Dentistry**, vol. 6, p. 408-14, 2012.

KOULAOUZIDOU, E.; HELVATJOGLU-ANTONIADES, M.; PALAGHIAS, G.; KARANIKAKOUMA, A.; ANTONIADES, D. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 271-76, 2007.

LIBONATI, A.; MARZO, G.; KLINGER, F.; FARINI, T.; GALLUSI, G.; TECCO, S.; MUMMOLO, S.; DE FELICI, M.; CAMPANELLA, V. Embriotoxicity assays for leached components from dental restorative materials. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 136, p. 1-6, 2011.

MAEDA, T.; YAMAGUCHI, K.; TAKAMISAWA, T.; RIKUTA, A.; TSUBOTA, K.; ANDO, S.; MIYASAKI, M. pH changes on self-etching primers mixed with powdered dentine. **Journal of Dentistry**, v. 36, p. 606-10, 2008.

MALCOK, S.; COREKCI, B.; ULKER, H.; YALÇIN, M.; SENGÜN, A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. **Angle Orthodontists**, v. 80, n. 4, p. 759-64, 2010.

MOHARAMZADEH, K; BROOK, IM; VAN NOORT, R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. **MATERIALS**, v.2, p. 514-548, 2009.

OGLIARI, F.A.; ELY, C.; ZANCHI, C.H.; FORTES, C.B.; SAMUEL, S.M.; DEMARCO, F.F.; PETZHOLD, C.L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, London, v.24, p.165-71, 2008.

PERDIGÃO, J. New developments in dental adhesion. **The Dental Clinics of North America**, v. 51, p. 333-57, 2007.

REICHEL, F.; SEISS, M.; BUTERS, J.; BEHRENDT, H.; HICKEL, R.; DURNER, J. Expression of CYP450-2E1 and formation of 2,3-epoxymethacrylic acid (2,3-EMA) in human oral cells exposed to dental materials. **Dental Materials**, v. 26, p. 1151-6, 2010.

ROMAGUERA, C.; VILAPLANA, J.; GRIMALT, R. (A). Dermatitis de contacto por resinas. **DENTUM, Revista de Materiales Dentales**. Barcelona, v. 4, p. 168-170, 2009.

ROMAGUERA, C.; VILAPLANA, J.; GRIMALT, R. (B). Diagnóstico de las dermatitis de contacto alérgicas en los usuarios y profesionales que contactan con metales y resinas incluídas en la manufactura de prótesis fijas y removibles y por sustancias contenidas en productos utilizados en la higiene bucal (pastas y colutorios). **DENTUM, Revista de Materiales Dentales**. Barcelona, v. 4, p. 157-160, 2009.

SAHABI, M.; SATTARI, M.; ROMOOZI, E.; BAGHBAN, A. Cytotoxicity comparison of Harvard zinc phosphate cement versus Panavia F2 and Rely X Plus resin cements on rat L929-fibroblasts. **Cell Journal**, v. 13, n. 3, p. 163-8, 2011.

SARAFIAN, V.; UZUNOVA, Y.; HAYRABEDYAN, S.; GANCHEVSKA, P.; FILIPOVA, M.; FILIPOV, I.; LUKANOV, L.; VLADIMIROV, S. Histo-blood group antigen expression and proliferative activity of fibroblasts treated with dental monomers. **Cell Biol Toxicol**, v. 24, p. 27-37, 2008.

SCHEDLE, A.; FRANZ, A.; RAUSCH-FAN, X.; SPITTLER, A.; LUCAS, T.; SAMORAPOOMPICHIT, P.; SPERR, W.; BOLZ-NITULESCU, G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. **Dental Materials**, v. 14, p. 429-40, 1998.

SCHMALZ, G. & ARENHOLT-BINDSLEV, D. Biocompatibility of Dental Materials. Leipzig: **Springer**, 2009, 379p.

SCHMID, M.; FRANZ, A.; KÖNIG, F.; BRISTELA, M.; LUCAS, T.; PIEHSLINGER, E.; WATTS, D.; SCHEDLE, A. Cytotoxicity of four categories of dental cements. **Dental Materials**, v. 25, p. 360-8, 2009.

SCHWIKL, H.; HILLER, K.; BOLAY, C.; KREISSL, M.; KREISMANN, W.; NUSSER, A.; STEINHAUSER, S.; WIECZOREK, J.; VASOLD, R.; SCHMALZ, G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 1713-19, 2005.

SEISS, M.; LANGER, C.; HICKEL, R.; REICHEL, F. Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. **Arch Toxicol**, v. 83, p. 1109-15, 2009.

SIDERIDOU, I.; TSERKI, V.; PAPANASTASIOU, G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. **Biomaterials**, v. 23, p. 1819-29, 2001.

SIGUSCH, B.; VÖLPEL, A.; BRAUN, I.; UHL, A.; JANDT, K. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composite. **Dental Materials**, v. 23, p. 1342-48, 2007.

SIGUSCH, B.; PFLAUM, T.; VÖLPEL, A.; GRETSCH, K.; HOY, S.; WATTS, D.; JANDT, K. Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. **Dental Materials**, v. 28, p. 312-19, 2012.

SZEP, S.; KUNKEL, A.; RONGE, K.; HEIDEMANN, D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives –in vitro testing on gingival fibroblast. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, p. 53-60, 2002.

TU, M.; LIANG, W.; WU, T.; CHEN, S.; evaluation of cytotoxicity of resin bonding materials toward human oral epithelial cells using three assay systems. **Journal of Dental Science**, v. 4, n. 4, p. 178-86, 2009.

ULKER, H.; SENGUN, A. Cytotoxicity evaluation of self adhesive composite resin cements by dentin barrier test on 3D pulp cells. **European Journal of Dentistry**, v. 3 p. 120-6, 2009.

ULKER, H.; HILLER, K.; SCHWEIKL, H.; SEIDENADER, C.; SENGUN, A.; SCHMALZ, G. Human and bovine pulp-derived cell reactions to dental resin cements. **Clinical Oral Investigation**, v. 16 p. 1571-8, 2012.

URCAN, E.; HAERTEL, U.; STYLLOU, M.; HICKEL, R.; SCHERTHAN, H.; REICHEL, F. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite componentes on human gingival fibroblasts. **Dental Materials**, v. 26, p. 51-8, 2010.

URCAN, E.; SCHERTHAN, H.; STYLLOU, M.; HAERTEL, U.; HICKEL, R.; REICHEL, F. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. **Biomaterials**, v. 31, p. 2010-14, 2010.

VAN LANDUYT, K.; SNAUWAERT, J.; DE MUNCK, J.; PEUMANS, M.; YOSHIDA, Y.; POITEVIN, A.; COUTINHO, E.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Dental Materials**, v. 28, p. 3757-85, 2007.

VAN LANDUYT, K.; NAWROT, T.; GEEBELEN, B.; DE MUNCK, J.; SNAUWAERT, J.; YOSHIHARA, K.; SCHEERS, H.; GODDERIS, L.; HOET, P.; VAN MEERBEEK, B. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. **Dental Materials**, v. 27, p. 723-47, 2011.

VAN LANDUYT, K.; YOSHIHARA, K.; GEEBELEN, B.; PEUMANS, M.; GODDERIS, L.; HOET, P.; VAN MEERBEEK, B. Should we be concerned about composite (nano-) dust? **Dental Materials**, v. 28, p. 1162-1170, 2012.

VAN LANDUYT, K.; HELLACK, B.; VAN MEERBEEK, B.; PEUMANS, M.; HOET, P.; WIEMANN, M.; KUHLBUSCH, T.; ASBACH, C. Nanoparticle release from dental composite. **Acta Biomaterialia**, p. 1-10, 2013.

VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C.; GRIMALT, R. Eccema de contacto alérgico: Fisiopatología. **DENTUM, Revista de Materiales Dentales**. Barcelona, v. 4, p. 155-156, 2009.

VISALLI, G.; BALUCE, B.; LA MAESTRA, S.; MICALE, R.; CINGANO, L.; DE FLORA, S.; DI PIETRO, A. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. **Archives of Toxicology**, v. 87, p. 179-87, 2013.

ZHANG, Y.; WANG, Y. (A). The effect of hydroxyapatite presence on the degree of conversion and polymerization rate in a model self-etching adhesive. **Dental Materials**, v. 28, p.237-44, 2012.

ZHANG, Y.; WANG, Y. (B). Improved degree of conversion and polymerization of model self-etching adhesives through their interaction with dentine. **Journal of Dentistry**, v. 40, p.57-63, 2012.

3 Relatório do trabalho de campo

O projeto inicialmente submetido à qualificação junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia consistiu no trabalho intitulado: “Citotoxicidade e grau de conversão de materiais resinosos: estudo *in vitro*”. Foram aceitas as sugestões da banca de qualificação do projeto e as modificações foram realizadas.

Algumas modificações no cronograma e no delineamento do projeto foram necessárias durante o desenvolvimento do presente projeto de pesquisa. A dificuldade em obter alguns materiais, acarretou na substituição de alguns. Nesse contexto, Empress Direct® (Ivoclar-Vivadent) e Cement-Post® (Angelus) não foram utilizados neste estudo. No lugar deles, Filtex Z350XT Flow (3M ESPE) e Variolink II (Ivoclar- Vivadent) foram utilizados. A substituição destes materiais, no primeiro momento, não condicionou a alteração das subseqüentes metodologias pelo motivo de que ambos materiais são de natureza polimérica e tem as mesmas indicações clínicas que os materiais substituídos.

Quanto a confecção dos espécimes, originalmente havia se planejado avaliar um total de 38 grupos, entre as diferentes combinações de materiais restauradores com a presença e a ausência da dentina. Baseado nas possíveis dificuldades para analisar e interpretar os resultados, optou-se por diminuir a 14 grupos experimentais. Embora esta redução, os grupos testados ainda representaram as condições mais comuns de combinações de materiais para a restauração, tanto direta quanto indireta, de dentes utilizando materiais poliméricos e por tanto, não representa nenhuma perda enquanto ao que era esperado dos resultados no trabalho.

As dificuldades para utilizar o equipamento de espectroscopia de micro-raman acabaram por inviabilizar o processo do teste de grau de conversão *in-situ* em cada um dos espécimes. Neste contexto, a decisão do comitê de orientação foi realizar o teste de grau de conversão de cada um dos materiais utilizando espectroscopia no infravermelho, metodologia com a qual poderiam-se obter resultados semelhantes.

De maneira geral, o projeto de pesquisa do presente trabalho passou por algumas modificações estruturais e metodológicas, porém os resultados finais obtidos foram semelhantes aos projetados.

4 Artigo

Cell behavior towards dental polymeric materials in contact with sound bovine dentin[§]

R Carrillo-Cotto^a, R Moraes^{b,*}, P Jardim^a, E Torre^a, M Kaizer^b, C Perelló^d, F Nedel^c, C Cuevas-Suárez^b, A Etges^d

^aDepartment of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

^bDepartment of Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cDepartment of Biotechnology, School of Dentistry, Catholic University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dDepartment of Pathology, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Key words:

cytotoxicity; polymeric materials; composites resins; resin cements; dental adhesives; self-adhesive materials, degree of conversion.

*Corresponding author:

e-mail: moraesrr@gmail.com

[§]Artigo formatado segundo as normas do periódico Dental Materials.

Abstract

Objective: To investigate the cellular viability of keratinocytes when they are in contact with different polymeric restorative materials types in the presence of dentin.

Methods: In order to simulate different clinical conditions, different direct and indirect restorations were performed on dentin bovine disks. Same restorative procedures were performed on glass plates to obtain a total of 14 experimental groups. The following materials were used according to the manufacturers' instructions: OptiBond FL® (OB), Single Bond Universal® (SBU), Clearfil SE® (CSE), Dyad Flow® (DF), Filtek Z350XT® (Z350), Filtek Z350XT® Flow (FF), Dyad Flow® (DF), Variolink II® (VLII) and Rely U200® (U200). Three specimens for each polymeric restorative material were tested (n=42). Restoration extracts were obtained from 1 and 7 days incubation of specimens in cell culture at 37°C. HaCaT keratinocytes were exposed to the eluates for 24h and the viability was assessed using the MTT assay.

Results: Statistics for cell viability at day 1 showed that the factor material and the interaction between factors were both significant ($p < 0.001$) and the presence of dentin was also a significant factor ($p = 0.023$). At day 7, both factors and their interaction were significant ($p < 0.001$). Statistical analyses by 95% confidence interval showed that there was no difference between CSE and OB, among DF, FF and U200, between SBU and Z350.

Significance: Clinically is probably that restorations using polymeric materials do not exert considerable aggression to gingival (HaCaT) cells.

1. Introduction

Dental resin composites became popular restorative materials due to their esthetics [1] and adhesive properties [2]. Resin-based materials are used as anterior and posterior restorative materials [2,3], whereas other popular applications include adhesive systems and luting agents. A typical dental composite consists in an organic matrix based on dimethacrylate monomers filled with reinforcing inorganic particles [4]. The polymerization of those materials occur by photo-activation; the amount of C=C, which are open and react during the polymerization process, is the so-called degree of C=C conversion. According to several studies that evaluated commercial composite resins, it was observed that the degree of conversion could vary between 35% and 78% [5-14].

Several factors contribute to the incomplete polymerization of resin-based materials in the oral environment. In addition to the presence of unreacted, pendant C=C due to polymer crosslinking and vitrification, contact with oxygen [9,15-16], distance from the light-curing source [17], and specific materials formulations [17] may account for the presence of unreacted monomers [5]. These unreacted monomers can be leached in the mouth and cause cytotoxicity problems [18,19], such as irritation of soft tissues [19,20] and pulp [19,21]. Cytotoxicity has been related to factors such as the amount and nature of leachable components [22], with an inverse correlation between the degree of conversion and the presence of leachable components documented [23].

Every year manufacturers introduce into the market novel polymer-based materials. These new materials, available for clinical use, have latterly included self-adherent composites, universal adhesives, and updated formulations of self-adhesive

luting agents. Continuous testing of the cytotoxicity potential of these materials is necessary [24,25] because several studies demonstrate the toxicity of restorative materials used in the mouth [1,26-32]. *In vitro* toxicity studies reflect better the clinical conditions when materials are tested in the same way they used in the mouth, particularly when in contact with dental tissues. The toxicity may change largely when the materials are analyzed as separate components [33]. When testing these materials, the contact with dentin is an important factor that is usually neglected in *in vitro* studies. Dentin has a strong buffer capacity against the acidity of some materials [34]. In the presence of hydroxyapatite, it has been shown that the photopolymerization of adhesives systems was significantly improved [35,36].

The aim of this study was to investigate the cellular viability of keratinocytes when they are in contact with different polymeric restorative materials types in the presence of dentin. The study hypothesis was that the contact with dentin would reduce the cytotoxic effects of the materials tested.

2. Materials and methods

2.1. Study design and materials tested

Eight different dental restorative resin materials were tested in this experiment: 3 composite types (regular composite, flowable composite, and self-adherent composite); 3 adhesive systems (3-step etch-and-rinse, 2-step self-etch, and universal 1-step adhesive); and 2 resin luting agents (regular and self-adhesive). Table 1 presents all materials tested, their manufacturers and detailed compositions. The materials were combined with each other according to their clinical use, resulting in 14 groups, as shown in Table 2. The presence or not of dentin in the analysis was

also taken into account. Control groups were defined by cell-control (negative control group) and dentin-control (positive control group). The response variables tested were degree of C=C conversion (n=5 per group) and cell viability (n=3 per group).

2.2. Preparation of specimens

A total of 42 dentin disks were obtained from freshly extracted bovine incisors. Test specimens were prepared using dentin disks of 6 mm in diameter and 2 mm in thickness. The enamel was removed and the occlusal dentin surfaces were wet-ground using 600-grit SiC abrasive papers to standardize the smear layer. The disks were subjected to prophylaxis procedure using a mix paste of pumice and water with Robinson brush, rinsed with distilled water, and dried with absorbent paper. Dentin disks, materials, instruments, and equipment were exposed to 30 min of UV irradiation in each side into a laminar flow cabinet. Under sterilization conditions into the same cabinet environment, each specimen was manufactured in a silicone matrix with 6 mm diameter and 4 mm thick. The fabrication of 84 specimens was performed according with restorative procedures described in Table 1. From this group of 84 specimens, 42 of them were build-up on the dentin disks and the other 42 on a transparent plastic matrix strip lying on a glass plate. Different restorative conditions were used in order to simulate the clinical conditions.

Besides, indirect composite restorations were made filling uncured Filtek Z350 composite into silicone matrix of 6 mm diameter. The composite was firstly photo-activated and then thermo-activated (microwave at 500 W for 5 min) to simulate indirect laboratorial restorations [37]. Adhesives and direct composites were photo-activated at a distance of 8 mm to simulate a proximal cavity box in a molar. All specimens were light-cured using a LED unit (Radii® Curing Light; SDI, Bayswater,

Victoria, Australia) according to the manufacturers' instructions. The intensity of the light (800 mW/cm^2) was monitored by means of a potentiometer (Ophir Optronics, Danvers, MA, USA). In case of cemented restorations, disks were underwent to a 750 g weight for 2 min and then photo-cured [38] through its occlusal, vestibular and lingual sides, according manufacturer's recommendations.

2.3. Degree of C=C conversion

Five specimens for each polymeric restorative material were evaluated. The degree of conversion was evaluated using Fourier-transform infrared spectroscopy with a spectrometer (Prestige 21, Shimadzu, Tokyo, Japan) equipped with an attenuated total reflectance device. The reflectance device was composed of a horizontal diamond crystal with a 45° mirror angle (PIKE Technologies, Madison, WI, USA). Spectra for the uncured materials (monomer) and cured material (polymer) were obtained in the absorbance mode in the range between 1750 and 1550 cm^{-1} , using 32 co-added scans, 4 cm^{-1} resolution, and 2.8 mm/s mirror speed. The degree of conversion was calculated based on the intensity of the carbon–carbon double-bond stretching vibrations (peak height) at 1635 cm^{-1} and using, as internal standard, the symmetric ring stretching at 1610 cm^{-1} .

2.4. Cell culture

Immortalized human skin HaCaT keratinocytes were donated from Department of Pathology, School of Dentistry of University of São Paulo, São Paulo, Brazil. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). They were grown at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air

and 5% CO₂. The experiments were performed with cells in the logarithmic phase of growth.

2.5 Cell viability assay

The specimens were exposed to 30-minute UV irradiation in each side into a laminar flow cabinet. Three specimens for each polymeric restorative material were tested. Specimens were incubated in 1 mL of DMEM/F12, in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂, half of them for 1 day and the other half for 7 days. After this period, specimens were removed and the extracts triplicates were combined and filtered (0.22 µm, Millex, Milipore, São Paulo, Brazil).

The viability of HaCaT cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water insoluble formazan. Briefly, cells were seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 100 µL in 96-well plates and grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air for 24 h before being used in the MTT assay. Cells were incubated with extracts for 1 and 7 days. After that, 20 µL of MTT (5 mg MTT/mL solution) was added to each well. The plates were incubated for an additional 4 h and the medium was discarded. 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well, and the formazan was solubilized on a shaker for 5 min at 150 rpm. The absorbance of each well was read on a micro-plate reader (MR-96A, Mindray Shenzhen, China) at a wavelength of 450 nm. All observations were validated by at least two independent experiments and for each experiment the analyses were performed in triplicate.

2.6 Statistical analyses

The cell viability data were submitted to a Two-way Analysis of Variance

(factors: material and presence of dentin or not) separately for each incubation time (1 day or 7 days). The data were transformed into ranks before the analyses. All pairwise multiple comparison procedures were carried out using the Student-Newman-Keuls' test. A significance level of $\alpha=0.05$ was considered in all analyses, which were carried out using SigmaPlot v.11 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Degree of conversion: For each group, 95% confidence intervals (CI) for the means were calculated. Groups were considered statistically different when the CI bounds did not overlap.

3. Results

3.1. Degree of C=C conversion

Statistical analyses by 95% confidence interval showed that there was not difference between CSE and OB, and among DF, FF, U200 and Z350, and between Z350 and SBU. The highest degree of C=C conversion was shown in Clearfil SE adhesive and the lowest in Single Bond Universal adhesive (Table 3).

3.2. Cell viability assay

Statistics for cell viability at day 1 showed that the factor material and the interaction between factors were both significant ($p<0.001$). The presence of dentin was a significant factor ($p=0.023$) (Fig 1). At day 7, both factors and their interaction were significant ($p<0.001$) (Fig. 2).

After 1 day, there was no difference between VLII and FF, control and SBU, and

FF and DF considering cell viability among the different restorative materials in contact without dentin. Similar situation also occurred with some of those groups in contact to dentin like between OB and U200, SBU and FF, and U200 and VLII. The presence of dentin did not affect the cell viability, only in FF and U200 group materials (Fig 1).

After 7 days, considering cell viability among the different restorative materials without dentin contact, there was no difference between CSE and VLII, control and SBU, OB and FF, and SBU and DF. Similar situation also occurred with some of those groups in contact with the dentin like between FF and control, and DF and OB. Besides, there was difference between every material in contact or without contact to dentin (Fig 2).

4. Discussion

In this study, the cell viability of human keratinocytes after contact with eluates from different adhesives, composites and resin cements after its polymerization was examined, both on the presence of dentin or not. There are very few studies *in vitro* that tested HaCaT cells in contact with polymeric dental materials but this is the first one that tested these cells type in contact with different polymeric dental materials and dentin at the same time, simulating clinical conditions.

According to this study results, the investigation hypothesis was partially accepted. Generally, after 1 day of cell culture, the presence of dentin promoted higher cell viability of the material tested, except for CSE, VLII, FF and U200 groups (Fig 1). The dentin positive control also showed the highest keratinocytes proliferation, which demonstrates that growth factors are still remaining into the

dentin tissue [39] and that the dentin has an important capacity of reduce the potential toxicity of the materials.

Surprisingly, CSE in the absence of dentin showed and increased keratinocytes proliferation when compared with other restorative materials. In addition, contrary to what it was observed in the other materials, cell proliferation was higher in the absence of dentin. This can be explained in part due to the fact that self-etch adhesives are less cytotoxic than total-etch adhesives [40]. Besides an increased cell proliferation response was probably provoked by a slightly aggression of a CSE components release [41]. Monomers release is higher on the first 24 hours due to a hygroscopic expansion phenomenon and subsequent releasing monomers [42,43].

The results at 7 days help to demonstrate the importance of the presence of dentin to promote cell viability, mainly in OB, SBU, DF, FF, and U200 restorative groups, whose showed higher cell viability when compared to their respective non-dentin contact groups. CSE and VLII groups, in the absence of dentin, showed higher cell proliferation probably due to a slightly aggression to keratinocytes when compared to their respective dentin contact groups. Such observations may probably be explained by the possible cytotoxic effects of components leached from these materials or because of their low pH attack and their involvement in releasing bio-active signaling molecules from the dentine matrix [44-47].

There was not any difference between cell-control groups after 1 day and 1 week (Fig. 1, 2) when was compared cell viability. However, after one week, cell viability in dentin-control group decreased when compared to those after 1 day, probably due to exhaustion of cells nutrients and dentin growth factors after 7 days

keratinocytes culture.

In general, there was not a marked cytotoxicity showed among all the polymeric restorative materials groups used in this study, especially when the dentin is present. Those groups, where restorations were performed without the presence of dentin, had a higher surface contact area with culture medium in the incubation period, and thus, hygroscopic phenomena occurred to a higher rate leading to an increase in the quantity of components released.

The results of this study showed that there were statistic significant differences in cell viability among some groups of polymeric materials. But overall, as was said, no marked cytotoxicity was observed in any of the sets of restorative materials.

It is speculated that a refined technique of handling, according to the manufacturer and the quality of material production, can influence cell viability of the oral tissues. Nevertheless, a long-term effect of adhesives and dental cements should be noted in restored deep cavities when in contact dentin and gums.

According with this study, the presence of dentin was important in cell viability, and it probably should occur clinically since restorative materials will be almost always in contact with it or soft oral tissue (gingiva).

It was observed that two (CSE and VLII) of the first three polymeric materials groups, that showed higher degree of conversion, reached higher cell viability too in the absence of dentin in comparison with those in contact with dentin, specially after seven days of extracts exposure. One possible explanation is that the excess of humidity within dentin could inhibit the free-radical polymerization of those materials increasing the amount of leachable components reducing cell viability [48]. VLII and CSE showed different behavior when compared with the rest of the polymeric materials tested here. Although it is difficult to explain, this lower cell viability is

probably related to the way in which these materials interact with the dentine. The humidity of the tissue and the hydrophilicity, wettability and degree of conversion of the materials could be related to the cell viability. As these results can be considered atypical, it is suggested that further analyzes of cell viability of these materials in contact with dentin must be done.

Besides, differences were found in the degree of conversion among some materials. So, it was showed that the degree of conversion was the highest in CSE and the lowest in Single Bond Universal. That result could be understood due to Single Bond Universal as one-bottle self-adhesive system consisting in complex formulations. It includes, at least, acidic functional monomers, solvents and silane which could induce inhibition of free-radical polymerization [49].

5. Conclusions

In spite of the limitations of this study, it can be concluded that dentin is capable of improving cell viability in HaCat cells, even in the presence of dental restorative materials.

Different chemical reactions among the resin-based materials components and among these components with dentin do not exert considerable aggression to HaCat cells. In addition, significant statistic differences were showed among degree of conversion of some isolated materials, whose characteristics could not be correlated with the cell viability.

The combination of different polymeric groups, to simulate clinical situations, did not show substancial interference with cellular viability.

References

1. Darmani H, Al-Hiyasat A and Milhem M. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. *Quintessence Int*, 2007; 38:89-95.
2. Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE and Mount GJ. Minimal intervention dentistry – a review*. *Int Dent J*, 2000; 50:1-12.
3. Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G and Schweikl H. A review of adaptative mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 2013; 34:4555-4563.
4. Ogliari FA, Ely C, Zanchi CH, Fortes CB, Samuel SM, Demarco FF, Petzhhold CL and Piva E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. *Dent Mater*, 2008; 24:165-171.
5. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D. *Biocompatibility of Dental Materials*. Leipzig: Springer; 2009. Chapter 5.
6. Ferracane, JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*, 1994; 21:441-452.
7. Ferracane, JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1995; 6:302-318.
8. Ferracane, JL and Condon, JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater*, 1990; 6:282-287.
9. Bakopoulou, A, Papadopoulos T and Garefis, P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*, 2009; 10:3861-3899.
10. Tarle, Z, Meniga, A, Knezevix, A, Sutalo, J, Risti, XM and Pichler, G. Composite conversion and temperature rise using a conventional, plasma arc, and an experimental blue LED curing. *J Oral Rehabil*, 2002; 29:662-667.
11. Yoon, TH, Lee, YK, Lim, BS and Kim, CW. Degree of polymerization of resin

composites by different light sources. J Oral Rehabil, 2002; 29:1165-1173.

12. Ferracane, JL and Condon, J.R. Post-cure heat treatments for composites: Properties and fractography. Dent Mater; 1992; 8:290-295.

13. Knobloch, LA, Kerby, RE, Seghi, R and van Putten, M. Two body wear resistance and degree of conversion of laboratory processed composite materials. Int J Prosthodont, 1999; 12:432-438.

14. Peutzfeldt, A and Asmussen, E. The effect of postcuring on quantity of remaining double bonds mechanical properties and *in vitro* wear of two resin composites. J Dent, 2000; 28:447-452.

15. Yap AU, Han VT, Soh MS, Siow KS. Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. Oper Dent, 2004; 29:448–453.

16. Franz A, König F, Lucas T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree of conversion. Dent Mater, 2009; 25:232–239.

17. Thomé T, Steagall Jr. W, Tachibana A, Braga S and Turbino M. Influence of the distance of the curing light source and composite shade on hardness of two composites. J Appl Oral Sci, 2007; 15(6):486-491.

18. Sigusch B, Völpel A, Braun I, Uhl A and Jandt, K. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composite. Dent Mater, 2007; 23:1342-1348.

19. Sigusch B, Pflaum T, Völpel A, Gretsche K, Hoy S, Watts D and Jandt K. Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. Dent Mater, 2012; 28:312-319.

20. Sideridou I, Tserki V and Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. Biomaterials, 2002; 23:1819-1829.

21. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin

components: a review. Clin Oral Inves, 2008; 12:1-8.

22. Karaoglanoglu S, Akgül N, Orçun Y, Öz dabak N, Yilmaz S, Ünal L and Seven N. Cytotoxicity evaluation of seven different resin based restorative materials: in vitro study. Mater Res Innov, 2010; 14:243-246.

23. Durner J, Obermaier J, Draenert M and Ilie N. Correlation of the degree of conversion with the amount of elutable substances in nano-hybrid dental composites. Dent Mater, 2012; 28:1146-1153.

24. Schweikl H, Hiller K, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wieczorek J, Vasold R and Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. Biomaterials, 2005; 26:1713-1719.

25. Visalli G, Baluce B, La Maestra S, Micale R, Cingano I, De Flora S and Di Pietro A. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. Arch Toxicol, 2013; 87:179-187.

26. Ausiell P, Cassese A, Miele C, Beguinot F, Garcia-Godoy F, Di Jeso B and Ulianich L. Cytotoxicity of dental resin composites: an *in vitro* evaluation. J Appl Toxicol, 2013; 33:451-457.

27. Banava S, Najibfard K, Garcia-Godoy F, Saghiri M, Ghahremani M and Ostad N. Impact of dilution and polymerization on cytotoxicity of dentin adhesives to human gingival fibroblasts: early exposure time. JODDD, 2015; 9(3):151-158.

28. Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook I and Scutt A. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. Dent Mater, 2007; 23:40-44.

29. Demirci M, Hiller K, Bosl C, Galler K, Schmalz G and Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity by dental adhesives. Dent Mater, 2008; 24:362-371.

30. Durner J, Wellner P, Hickel R and Reichel F. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. Dent Mater, 2012; 28:818-823.

31. Furche S, Hickel R, Reichl F, van Landuyt K, Shehata M and Durner J. Quantification of elutable substances from methacrylate based sealers and their cytotoxicity effect on with human gingival fibroblasts. *Dent Mater*, 2013; 29:618-625.
32. Kierklo A, Pawinska M, Tokajuk G, Poplawska B and Bielawska A. Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, *ex vivo*. *Adv Med Sci*, 2012; 57(2):385-390.
33. Fano V, Shatel M and Tanzi M. Release phenomena and toxicity in polymer-based dental restorative materials. *Acta Biomed*, 2007; 78:190-197.
34. Maeda T, Yamaguchi K, Takamisawa T, Rikuta A, Tsubota K, Ando S and Miyasaki M. pH changes on self-etching primers mixed with powdered dentine. *J Dent*, 2008; 36:606-610.
35. Zhang Y and Wang Y. The effect of hydroxyapatite presence on the degree of conversion and polymerization rate in a model self-etching adhesive. *Dent Mater*, 2012; 28:237-244.
36. Zhang Y and Wang, Y. Improved degree of conversion and polymerization of model self-etching adhesives through their interaction with dentine. *J Dent*, 2012; 40:57-63.
37. Soares CJ, Pizi ECG, Fonseca RB and Martins LRM. Mechanical properties of light-cured composites polymerized with several additional post-curing methods. *Oper Dent*, 2005; 30:389-394.
38. Valentini F, Moraes R, Pereira-Cenci T and Boscato N. Influence of glass particle size of resin cements on bonding to glass ceramics: SEM and bond strength evaluation. *Microsc Res Tech*, 2014; 77:363-367.
39. Smith AJ. Vitality of the Dentin-Pulp Complex in Health and Disease: Growth Factors as Key Mediators. *J Dent Educ*, 2003; 67 (6):678-689.
40. Tuncer S, Demirci F, Schweikl H, Erguven M, Bilir A and Tuncer AK. Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after direct and indirect exposure *in vitro*, 2002; 16:1635-1646.

41. Kusdemir M, Gunal, S, Ozer F, Imazato S, Izutani N, Ebisu, S and Blatz MB. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dent Mat J*, 2011; 30(6):799-805.
42. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mat*, 2006; 22:211-222
43. Gupta S, Saxena P, Pant V and Pant A. *Toxicol Int*, 2012; 19(3):225-234.
44. Murray PE and Smith AJ. Saving Pulp—A Biological Basis. An Overview *Prim Dent Care*, 2012; 9(1):21-26.
45. Ferracane JL, Cooper PR and Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin–pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*, 2010; 98:2–14.
46. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM and Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix, *Arch of Oral Biol*, 2012; 57:109–121.
47. Smith AJ, Lumley PJ, Tomson PL and Cooper PR. Dental regeneration and materials—a partnership. *Clin Oral Invest*, 2008; 12:103–108.
48. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, Navarro, MF and Santos CF. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci*, 2009; 17(6):544-554.
49. Boeira PO, Meereis CT, Cuevas CE, Almeida SM, Piva E and Lima GS. Coumarin-based iodonium hexafluoroantimonate as an alternative photoinitiator for experimental dental adhesives resin. *Appl Adhes Sci*, 2017; 5(2):1-11.

Table 1. Composition of the materials evaluated in this study

Material	Manufacturer	Components	Lote #	Procedure
Dyad Flow	Kerr	<i>Filler:</i> Prepolymerized filler, 1-μm barium glass filler, nanosized colloidal silica, nanosized ytterbium fluoride <i>Organic matrix:</i> GPDM, methacrylate ester monomers, initiators, stabilizers, pigments	4910830	d, p, q, s, t, u, n
Filtek Z350 XT	3M ESPE	<i>Filler:</i> 78.5% wt of nonagglomerated/nonaggregated 20 nm nanosilica filler, agglomerated zirconia/silice nanocluster (5 and 20 nm). The cluster particle size range is 0.6 and 1.4 μm. <i>Organic matrix:</i> Bis-GMA, UDMA, TEGDMA and BIS-EMA	11295	a, b, c, d, e, g, h, i, l, m, n, r, n
Filtek Flow Z350 XT	3M ESPE	<i>Filler:</i> 72.5% wt of a combination of nonagglomerated/ nonaggregated 20 nm silica filler, nonagglomerated/ nonaggregated 4-11 nm zirconia filler, and aggregated zirconia/silica cluster filler (comprised of 20 nm silica and 4-11 nm zirconia particles). <i>Organic matrix:</i> Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, Bis-EMA	N509855	a, b, c, d, e, g, h, i, l, m, n, q, s, t, u, n
OptiBond FL	Kerr	<i>Primer:</i> HEMA, GPDM, PAMM, camphorquinone, ethanol, water.	5097479 5097480	a, b, c, d, e, g, h, i, l, m, n

		<i>Bond:</i> Bis-GMA, HEMA, GDMA, barium alumina borosilicate, silica, camphorquinone <i>Etchant:</i> 37% phosphoric acid, water, synthetic amorphous silica, polyethylene glycol, aluminum oxide		
Single Bond Universal	3M ESPE	<i>Bond:</i> MDP, dimethacrylate resins, HEMA, Bis-GMA, methacrylate-modified polyalkenoic acid copolymer, filler, ethanol, water, initiators, silane <i>DC Activator:</i> Eodium toluene sulfinatate, ethanol *Not used	582957	d, j, l, m, o
Clearfil SE Bond	Kuraray	<i>Primer:</i> MDP, HEMA, hydrophilic aliphatic dimethacrylate, di-camphorquinone, N,N- diethanol p- toluidine, water <i>Bond:</i> MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic aliphatic dimethacrylate, di-camphorquinone, N,N- diethanol p-toluidine, colloidal silica	01233A 01865A	d, f, g, h, k, l, o
Variolink II	Ivoclar Vivadent	<i>Base:</i> Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, inorganic filler, ytterbium trifluoride, initiator, stabilizer <i>Catalyst:</i> Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, inorganic filler, ytterbium trifluoride, benzoyl peroxide, stabilizer	S26629 S01957	a, b, c, d, e, g, h, i, l, m, n, v, w, x, y, a1, b1, c1, d1, t, u, e1, f1, g1, h1
RelyX U200	3M ESPE	<i>Base paste:</i> Silane-treated powder, 2-propenoic	588286	v, w, x, z, a1, b1,

acid, 2-methyl-, 1,1'-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl]	[1-	c1, d1, t, u, i1, f1, j1, k1
ester, reaction products with 2-hydroxy- 1,3-propanediyl, dimethacrylate and phosphorus oxide, TEGDMA, silane-treated silica, sodium persulfate, glass powder, tert-butyl peroxy-3,5,5-trimethylhexanoate		
<i>Catalyst paste:</i> Silane-treated glass powder, substituted dimethacrylate, silane-treated silica, sodium p-toluenesulfinate 1-benzyl-5-phenyl-barbic-acid,		
calcium salt 1,12-dodecane dimethacrylate, calcium hydroxide, titanium dioxide		

GPDM = glycerol phosphate dimethacrylate acid; Bis-GMA = bisphenyl A diglycidyl methacrylate; UDMA = urethane dimethacrylate; TEGDMA = triethylene glycol dimethacrylate; Bis-EMA = ethoxylated bisphenol A dimethacrylate; HEMA = 2-hydroxyethyl methacrylate; PAMM = phthalic acid monoethyl methacrylate; GDMA = glycerol dimethacrylate; MDP = 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate.

a: acid etch surface with 35% H₃PO₄ for 15 s; b: rinse with water for 15 s; c: remove excess dentin moisture with absorbent paper; d: positioning of the 4mm thickness dimethyl-polysiloxane mold; e: active primer application for 15 s; f: active primer application for 20 s; g: remove excess primer with micro-brush; h: air thin for 15 s; i: active bonding agent application for 15 s; j: active bonding agent application for 20 s; k: bonding agent application and air thin for 15 s; l: remove excess adhesive with micro-brush; m: air thin for 15 s; n: light activation for 20 s; o: light activation for 10 s; p: active 0.5 layer flow composite application for 20 s; q: flow composite restoration; r: composite restoration; s: positioning of the polyester matrix; t: positioning of the 1mm thickness slide glass over polyester matrix; u: positioning of the 5mm elastomer mold thickness over the slide glass; v: silane application to composite photo-polymerized (20 s) and immediately heat-polymerized (5 m) restoration for 5 s; w: wait for drying silane for 1 m; x: air thin for 15 s; y: mixture base and catalyst pastes cement for 10 s; z: mixture base and catalyst pastes cement for 20 s; a1: cement application to polymerized composite restoration; b1: positioning of indirect composite restoration; c1: positioning of 750g load on indirect composite restoration for 2 minutes; d1:

remove 750g load; e1: light activation of occlusal face for 40 s; f1: remove elastomer mold; g1: light activation of buccal face for 40 s; h1: light activation of lingual face for 40 s; i1: light activation of occlusal face for 20 s; j1: light activation of buccal face for 20 s; k1: light activation of lingual face for 20 s.

Table 2. Groups and combinations of materials tested. In left column is showed the groups that were in non-contact with dentin (NCD). In middle column is showed groups were in contact with dentin (CD). In right column is showed all different dental materials combinations.

Groups		Restorative materials
NCD/Without keratinocytes contact	CD/With keratinocytes contact	
Cell-control		
OB	OB+d	Ac + OB + Z350
SBU	SBU+d	SBU + Z350
CSE	CSE+d	CSE + Z350
DF	DF+d	DF
FF	FF+d	Ac + OB + FF
VLII	VLII+d	Ac + OB + VLII + Z350
U200	U200+d	U200 + Z350
	Dentin-control	

Table 3. Results for degree of C=C conversion, %

Material	Median	95% confidence interval
Clearfil SE Bond	71	66-76 ^A
OptiBond FL	67	66-68 ^A
Variolink II	60	58-61 ^B
Dyad Flow	52	50-56 ^C
Z350 XT Flow	49	47-51 ^C
RelyX U200	49	47-51 ^C
Z350 XT	44	39-48 ^{CD}
Single Bond Universal	40	33-46 ^D

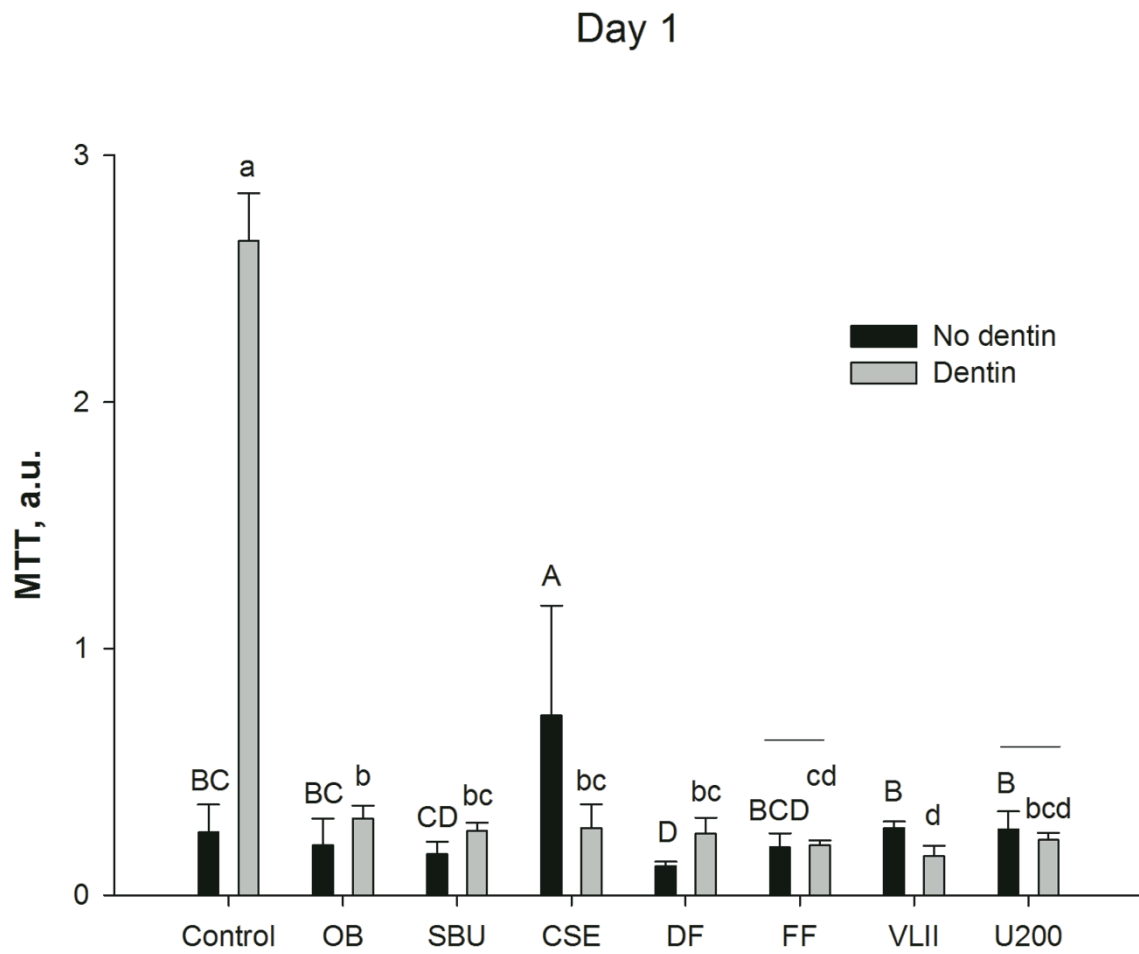


Fig. 1. Means + standard deviations for cell viability at day 1. Differences between groups are indicated by uppercase letters (no dentin groups) and lowercase letters (dentin groups). Lines above bars connect groups that were statistically similar for the presence of dentin or not ($p < 0.05$).

Day 7

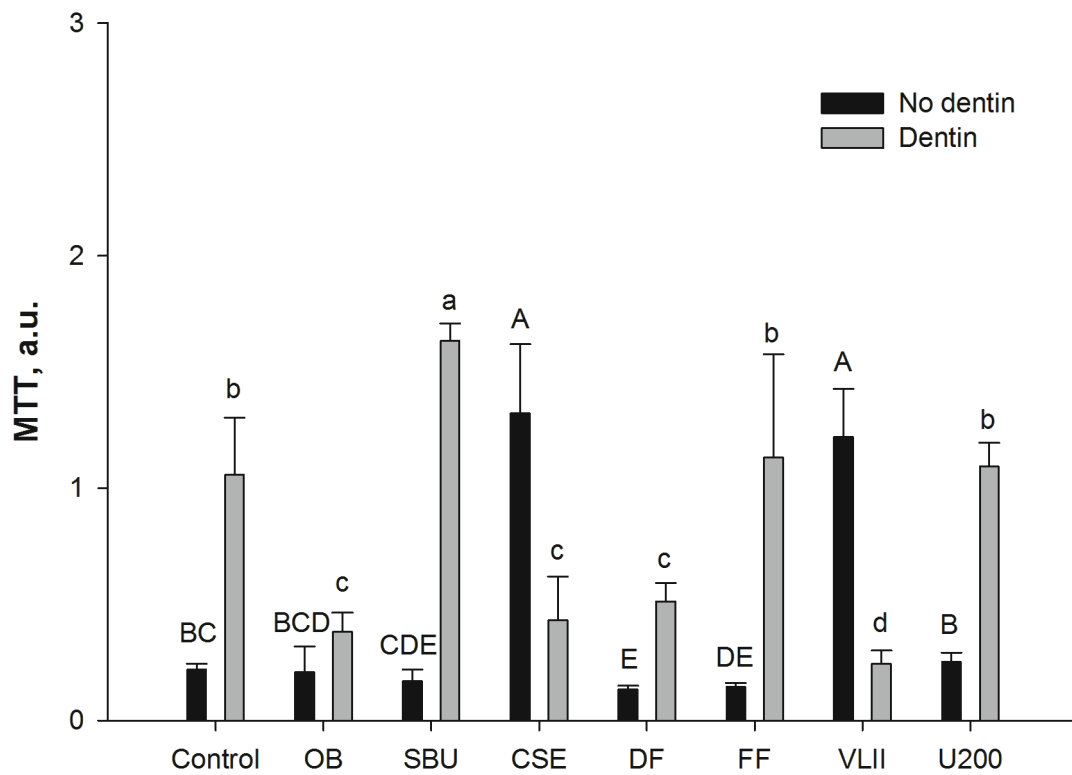


Fig. 2. Means + standard deviations for cell viability at day 7. Differences between groups are indicated by uppercase letters (no dentin groups) and lowercase letters (dentin groups). Lines above bars connect groups that were statistically similar for the presence of dentin or not ($p < 0.05$).

6 Considerações finais

Após a análise dos resultados do presente estudo, é possível concluir que a dentina é capaz de melhorar a viabilidade celular nas células HaCat, embora quando em contato com materiais dentários restauradores.

A combinação de distintos grupos poliméricos para simular situações clínicas não mostrou diferença substancial na viabilidade celular. Distintas reações químicas entre os componentes dos materiais resinosos e entre esses componentes com a dentina não exercem considerável agressão sobre as células HaCat. Além disso, embora se demonstrasse diferenças estatisticamente significativas entre o grau de conversão dos materiais separadamente, tais características poderiam não ter correlação com sua viabilidade celular.

Em geral pode-se concluir que a viabilidade celular pode depender da composição dos materiais utilizados na confecção das restaurações. O efeito a longo prazo dos materiais deve ser observado em cavidades profundas onde os materiais ficam ao mesmo tempo em contato com dentina e gengiva.

Referências

- ANDERSSON, J.; DAHLGREN. HEMA Enhances IgG! Production by human B-cells *in vitro*. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 89, p. 1461-1464, 2010.
- ANUSAVICE, K.J. Phillips Materiais Dentários. 11 Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005, 764p.
- ANZILIERO, G.; DIHL, R.; LEHMANN, M.; REGULY, M.; RODRIGUES, H. Genetic toxicology of dental composite resin extracts in somatic cells in vivo. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, p. 625-629, 2010.
- AUSIELLO, P.; CASSESE, A.; MIELE, C.; BEGUINOT, F.; GARCÍA-GODOY, F.; DI JESO, B.; ULIANICH, L. Cytotoxicity of dental resins composites: an in vitro evaluation. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 451-457, 2013.
- BAKOPOULOU, A.; PAPADOPOULOS, T.; GAREFIS, P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p.3861-3899, 2009.
- BANAVA, S.; NAJIBFARD, K.; GARCIA-GODOY, F.; SAGHIRI, M.; GHAHREMANI, M.; OSTAD N. Impact of dilution and polymerization on cytotoxicity of dentin adhesives to human gingival fibroblasts: early exposure time. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 9, n. 3, p.151-158, 2015.
- BECHER, R.; KOPPERUD, H.; AL, R; SAMUELSEN, J.; MORISBAK, E.; DAHLMAN, H.; LILLEAAS, E.; DAHL, J. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA, and two compomer extracts. **Dental Materials**, v. 22, p.630-640, 2006.
- BEUN, S.; BAILLY, C.; DABIN, A.; VREVEN, J.; DEVAUX, J.; LELOUP, G. Rheological properties of experimental Bis-GMA/TEGDMA flowable resin composites with various macrofiller/microfiller ratio. **Dental Materials**, v. 25, p.198-205, 2009.
- BEUN, S.; GLORIEUX, T.; DEVAUX, J.; VREVEN, J.; LELOUP, G. Characterization of nanofilled compared to universal and microfilled composites. **Dental Materials**, v. 23, p.51-59, 2007.
- BLASIAK, J.; SYNOWIEC, E.; TARNAWSKA, J.; CZARNY, P.; POPLAWSKI, T.; REITER, R. Dental methacrylates may exert genotoxic effects via the oxidative induction of DNA double strand breaks and the inhibition of their repair. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p.7487-7496, 2012.
- BOEIRA, P.O.; MEEREIS, C.T.; CUEVAS, C.E.; ALMEIDA, S.M.; PIVA, E.; LIMA, G.S. Coumarin-based iodonium hexafluoroantimonate as an alternative photoinitiator for experimental dental adhesives resin. **Applied Adhesion Science**, v. 5 n. 2 p.1-11. 2017.

BRAGA, R.R.; BALLESTER, R.Y.; FERRACANE, J.L. Factors involved in the development of polymerization shrinkage stress in resin-composites: a systematic review. **Dental Materials**, v.21, 962-970, 2005.

BRUJINZEEL-KOOMEN, C.; MUDDLE, G; BRUJINZEEL, P. The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in atopic dermatites and their significance for its pathogenesis. **Allergic Immunologic**, Paris, v. 21, p.219-223, 1989.

CAUGHMAN, W.; CAUGHMAN, G.; SHIFLETT, R. Correlation of citotoxicity, filler loading and curing time of dental composites. **Biomaterials**, London, v. 12, p.737-740, 1991.

DARMANI, H.; AL-HIYASAT, A.; MILHEM, M. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. **Quintessence International**, v. 38, n. 9, p. 789-795, 2007.

DEMIRCI, M.; HILLER, K.; BOSL, C.; GALLER, K.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity by dental adhesives. **Dental Materials**, v. 24, p.362-371, 2008.

DRUMMOND, J.L.; SAVERS, E.E., In vitro aging of a heat/pressure-cured composite. **Dental Materials**, v. 9, p.214-216, 1993.

DURNER, J.; OBERMAIER, J.; DRAENERT, M.; ILIE, N. Correlation of the degree of conversion with the amount of elutable substances in nano-hybrid dental composites. **Dental Materials**, v. 28, p.1146-1153, 2012.

DURNER, J.; WELLNER, P.; HICKEL, R.; REICHL, F. Synergistic interaction caused to human gingival fibroblast from dental monomers. **Dental Materials**, v. 28, p. 818-823, 2012.

ERGUN, G.; EGILMEZ, F.; YILMAZ, S. Effect of reduce exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power LED. **Journal of Appliance Oral Science**, v. 19, n. 3, p. 286-292, 2011.

FANO, V.; SHATEL, M.; TANZI, M. Release phenomena and toxicity in polymer-based dental restorative materials. **Acta Biomédica**, v. 78, p.190-197, 2007.

FERRACANE, J.L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v. 22, p.211-222, 2006.

FERRACANE, J.L.; COOPER, P.R.; SMITH, A.J. Can interaction of materials with the dentin–pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology**, v. 98, p.2–14, 2010.

FERRACANE, J.L. Resin composite--state of the art. **Dental Materials**, v. 27, p.29-38, 2011.

FERRACANE, J.L.; CONDON, J.R. Post-cure heat treatments for composites: Properties and fractography. **Dental Materials**, v. 8, p.290-295, 1992.

FERRACANE, J.L.; CONDON, J.R. Rate of elution of leachable components from composite. **Dental Materials**, v. 6, p.282-287, 1990.

FERRACANE, J.L. Current trends in dental composites. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 6, p.302-318, 1995.

FERRACANE, J.L. Elution of leachable components from composites. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 21, p.441-452, 1994.

FRANZ, A.; KÖNIG, F.; LUCAS, T.; WATTS, D.; SCHEDULE, A. Cytotoxic effects of dental bonding substances as a function of degree conversion. **Dental Materials**, v. 25, p. 232-239, 2009.

FURCHE, S.; HICKEL, R.; REICHL, F.; VAN LANDUYT, K.; SHEHATA, M.; DURNER, J. Quantification of elutable substances from methacrylate based sealers and their cytotoxicity effect on with human gingival fibroblastos. **Dental Materials**, v. 29, p. 618-625, 2013.

GOLDBERG M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. **Clinical Oral Investigations**, v. 12, p.1-8, 2008;

GUPTA, S.; SAXENA, P.; PANT, V.; PANT, A. **Toxicology International**, v. 19, n. 3, p.225-234, 2012.

KARAOGLANOGLU, S.; AKGÜL, N.; ORÇUN, Y.; ÖZDABAK, N.; YILMAZ, S.; ÜNAL, L.; SEVEN, N. Citotoxicity evaluation of seven different resin based restorative materials: in vitro study. **Materials Research Innovation**, v. 14, n. 3, p. 243-246, 2010.

KIERKLO, A.; PAWINSKA, M.; TOKAJUK, G.; POPLAWSKA, B.; BIELAWSKA, A. Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, *ex vivo*. **Advances in Medical Science**, v. 57, n. 2, p.385-390, 2012.

KLIENSASSER, N.; WALLNER, B.; HARRÉUS, U.; KLEINJUNG, T.; FOLWACZNY, M.; HICKEL, R.; KEHE, K.; REICHL, F. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Journal of Dentistry**, v. 32, p. 229-234, 2004.

KONG, N.; JIANG, T.; ZHOU, Z.; FU, J. Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. **Dental Materials**, v. 25, p. 1371-1375, 2009.

KORSUWANNAWONG, S.; SRICHAN, R.; VAJRABHAYA, L. Cytotoxicity evaluation of self-etching dentine bonding agents in a cell culture perfusion condition. **European Journal of Dentistry**, vol. 6, p. 408-414, 2012.

KOULAOUZIDOU, E; HELVATJOGLU-ANTONIADES, M.; PALAGHIAS, G.; KARANIKAKOUMA, A; ANTONIADES, D. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 271-276, 2007.

KNOBLOCH, L.A.; KERBY, R.E.; SEGHI, R.; VAN PUTTEN, M. Two body wear resistance and degree of conversion of laboratory processed composite materials. **International Journal of Prosthodontics**, v. 12, p.432-438, 1999.

KRIFKA, S.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. A review of adaptative mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. **Biomaterials**, v. 34, p.4555-4563, 2013.

KUSDEMIR, M.; GUNAL, S.; OZER, F.; IMAZATO, S.; IZUTANI, N.; EBISU, S.; BLATZ, M.B. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. **Dental Materials Journal**, v. 30, n. 6, p.799-805, 2011.

LIBONATI, A.; MARZO, G.; KLINGER, F.; FARINI, T.; GALLUSI, G.; TECCO, S.; MUMMOLO, S.; DE FELICI, M.; CAMPANELLA, V. Embriotoxicity assays for leached componentes from dental restorative materials. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 136, p. 1-6, 2011.

MAEDA, T.; YAMAGUCHI, K.; TAKAMISAWA, T.; RIKUTA, A.; TSUBOTA, K.; ANDO, S.; MIYASAKI, M. pH changes on self-etching primers mixed with powdered dentine. **Journal of Dentistry**, v. 36, p. 606-610, 2008.

MALCOK, S.; COREKCI, B.; ULKER, H.; YALÇIN, M.; SENGÜN, A. Cytotoxic effects of orthodontic composites. **Angle Orthodontists**, v. 80, n. 4, p. 759-764, 2010.

MANTRI, S.P.; MANTRI, S.S. Management of shrinkage stresses in direct restorative light-cured composites: a review. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 25, p.305-313, 2013.

MODENA, K.C.; CASAS-APAYCO, L.C.; ATTA, M.T.; COSTA, C.A.; HEBLING, J.; SIPERT, C.R.; NAVARRO, M.F.; SANTOS, C.F. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 6, p.544-554, 2009.

MOHARAMZADEH, K.; VAN NOORT, R.; BROOK, I.; SCUTT, A. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. **Dental Materials**, v. 23, p.40-44, 2007.

MOHARAMZADEH, K.; BROOK, I.M.; VAN NOORT, R. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. **Materials**, v.2, p.514-548, 2009.

MURRAY, P.E.; SMITH, A.J. Saving Pulp—A Biological Basis. An Overview. **Primary Dental Care**, v. 9, n. 1, p.21-26, 2012.

OGLIARI, F.A.; ELY, C.; ZANCHI, C.H.; FORTES, C.B.; SAMUEL, S.M.; DEMARCO, F.F.; PETZOLD, C.L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, London, v.24, p.165-71, 2008.

PERDIGÃO, J. New developments in dental adhesion. **The Dental Clinics of North America**, v. 51, p.333-357, 2007.

PEUTZFELDT, A.; ASMUSSEN, E. The effect of postcuring on quantity of remaining double bonds mechanical properties and *in vitro* wear of two resin composites. **Journal of Dentistry**, v. 28, p.447-452, 2000.

REICHEL, F.; SEISS, M.; BUTERS, J.; BEHRENDT, H.; HICKEL, R.; DURNER, J. Expression of CYP450-2E1 and formation of 2,3-epoxymethacrylic acid (2,3-EMA) in human oral cells exposed to dental materials. **Dental Materials**, v. 26, p.1151-1156, 2010.

ROMAGUERA, C.; VILAPLANA, J.; GRIMALT, R. (A). Dermatitis de contacto por resinas. **DENTUM, Revista de Materiales Dentales**. Barcelona, v. 4, p.168-170, 2009.

ROMAGUERA, C.; VILAPLANA, J.; GRIMALT, R. (B). Diagnóstico de las dermatitis de contacto alérgicas en los usuarios y profesionales que contactan con metales y resinas incluidas en la manufactura de prótesis fijas y removibles y por sustancias contenidas en productos utilizados en la higiene bucal (pastas y colutorios). **DENTUM, Revista de Materiales Dentales**. Barcelona, v. 4, p.157-160, 2009.

SAHABI, M.; SATTARI, M.; ROMOOZI, E.; BAGHBAN, A. Cytotoxicity comparison of Harvard zinc phosphate cement versus Panavia F2 and Rely X Plus resin cements on rat L929-fibroblasts. **Cell Journal**, v. 13, n. 3, p.163-168, 2011.

SARAFIAN, V.; UZUNOVA, Y.; HAYRABEDYAN, S.; GANCHEVSKA, P.; FILIPOVA, M.; FILIPOV, I.; LUKANOV, L.; VLADIMIROV, S. Histo-blood group antigen expression and proliferative activity of fibroblasts treated with dental monomers. **Cell Biol Toxicol**, v. 24, p.27-37, 2008.

SCHEDLE, A.; FRANZ, A.; RAUSCH-FAN, X.; SPITTLER, A.; LUCAS, T.; SAMORAPOOMPICHIT, P.; SPERR, W.; BOLZ-NITULESCU, G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. **Dental Materials**, v. 14, p.429-440, 1998.

SCHMALZ, G.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Biocompatibility of Dental Materials. 1 ed. Leipzig: **Springer**, 2009.

SCHMID, M.; FRANZ, A.; KÖNIG, F.; BRISTELA, M.; LUCAS, T.; PIEHSLINGER, E.; WATTS, D.; SCHEDLE, A. Cytotoxicity of four categories of dental cements. **Dental Materials**, v. 25, p.360-8, 2009.

SCHWEIKL, H.; HILLER, K.; BOLAY, C.; KREISSL, M.; KREISMANN, W.; NUSSER, A.; STEINHAUSER, S.; WIECZOREK, J.; VASOLD, R.; SCHMALZ, G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. **Biomaterials**, v. 26, p.1713-1719, 2005.

SEISS, M.; LANGER, C.; HICKEL, R.; REICHEL, F. Quantitative determination of TEGDMA, BHT, and DMABEE in eluates from polymerized resin-based dental restorative materials by use of GC/MS. **Archives of Toxicology**, v. 83, p.1109-1115, 2009.

SIDERIDOU, I.; TSERKI, V.; PAPANASTASIOU, G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. **Biomaterials**, v. 23, p.1819-1829, 2002.

SIGUSCH, B.; PFLAUM, T.; VÖLPEL, A.; GRETSCH, K.; HOY, S.; WATTS, D.; JANDT, K. Resin-composite cytotoxicity varies with shade and irradiance. **Dental Materials**, v. 28, p.312-319, 2012.

SIGUSCH, B.; VÖLPEL, A.; BRAUN, I.; UHL, A.; JANDT, K. Influence of different light curing units on the cytotoxicity of various dental composite. **Dental Materials**, v. 23, p.1342-1348, 2007.

SMITH, A.J.; LUMLEY, P.J.; TOMSON, P.L.; COOPER, P.R. Dental regeneration and materials—a partnership. **Clinical Oral Investigations**, v. 12, p.103–108, 2008.

SMITH, A.J.; SCHEVEN, B.A.; TAKAHASHI, Y.; FERRACANE, J.L.; SHELTON, R.M.; COOPER, P.R. Dentine as a bioactive extracellular matrix, **Archives of Oral Biology**, v. 57, p.109–121, 2012.

SMITH, A.J. Vitality of the Dentin-Pulp Complex in Health and Disease: Growth Factors as Key Mediators. **Journal of Dental Education**, v. 67, n. 6, p.678-689, 2003.

SOARES C.J.; PIZI, E.C.; FONSECA, R.B.; MARTINS, L.R. Mechanical properties of light-cured composites polymerized with several additional post-curing methods. **Operative Dentistry**, v. 30, p.389-394, 2005.

SOUZA, R.O.; OZCAN, M.; MESQUITA, A.M.; DE MELO, R.M.; GALHANO, G.A.; BOTTINO, M.A.; PAVANELLI, C.A. Effect of different polymerization devices on the degree of conversion and the physical properties of an indirect resin composite. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 23, p.129-135, 2010.

SZEP, S.; KUNKEL, A.; RONGE, K.; HEIDEMANN, D. Cytotoxicity of modern dentin adhesives –in vitro testing on gingival fibroblast. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, p. 53-60, 2002.

TARLE, Z, MENIGA, A, KNEZEVIĆ, A, SUTALO, J, RISTI, XM AND PICHLER, G. Composite conversion and temperature rise using a conventional, plasma arc, and an experimental blue LED curing. **Journal of Oral Rehabilitation**, 2002; 29:662-667.

THOMÉ, T.; STEAGALL, W.; TACHIBANA, A.; BRAGA, S.; TURBINO M. Influence of the distance of the curing light source and composite shade on hardness of two composites. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, n. 6, p.486-491, 2007.

TU, M.; LIANG, W.; WU, T.; CHEN, S.; evaluation of cytotoxicity of resin bonding materials toward human oral epithelial cells using three assay systems. **Journal of Dental Science**, v. 4, n. 4, p.178-186, 2009.

TUNCER, S.; DEMIRCI, F.; SCHWEIKL, H.; ERGUVEN, M.; BILIR, A.; TUNCER, A.K. Inhibition of cell survival, viability and proliferation by dentin adhesives after

direct and indirect exposure in vitro, **Clinical of Oral Investigations**, v. 16, p.1635-1646, 2002.

TYAS, M.J.; ANUSAVICE, K.J.; FRENCKEN, J.E.; MOUNT, G.J. Minimal intervention dentistry – a review*. **International Dental Journal**, v. 50, p.1-12, 2000.

ULKER, H.; HILLER, K.; SCHWEIKL, H.; SEIDENADER, C.; SENGUN, A.; SCHMALZ, G. Human and bovine pulp-derived cell reactions to dental resin cements. **Clinical Oral Investigation**, v. 16 p.1571-1578, 2012.

ULKER, H.; SENGUN, A. Cytotoxicity evaluation of self adhesive composite resin cements by dentin barrier test on 3D pulp cells. **European Journal of Dentistry**, v. 3 p.120-126, 2009.

URCAN, E.; HAERTEL, U.; STYLLOU, M.; HICKEL, R.; SCHERTHAN, H.; REICHEL, F. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite componentes on human gingival fibroblasts. **Dental Materials**, v. 26, p.51-58, 2010.

URCAN, E.; SCHERTHAN, H.; STYLLOU, M.; HAERTEL, U.; HICKEL, R.; REICHEL, F. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. **Biomaterials**, v. 31, p.2010-2014, 2010.

VALENTINI, F.; MORAES, R.; PEREIRA-CENCI, T; BOSCATO N. Influence of glass particle size of resin cements on bonding to glass ceramics: SEM and bond strength evaluation. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p.363-367, 2014.

VAN LANDUYT, K.; HELLACK, B.; VAN MEERBEEK, B.; PEUMANS, M.; HOET, P.; WIEMANN, M.; KUHLBUSCH, T.; ASBACH, C. Nanoparticle release from dental composite. **Acta Biomaterialia**, p.1-10, 2013.

VAN LANDUYT, K.; NAWROT, T.; GEEBELEN, B.; DE MUNCK, J.; SNAUWAERT, J.; YOSHIHARA, K.; SCHEERS, H.; GODDERIS, L.; HOET, P.; VAN MEERBEEK, B. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. **Dental Materials**, v. 27, p.723-747, 2011.

VAN LANDUYT, K.; SNAUWAERT, J.; DE MUNCK, J.; PEUMANS, M.; YOSHIDA, Y.; POITEVIN, A.; COUTINHO, E.; SUZUKI, K.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Dental Materials**, v. 28, p.3757-3785, 2007.

VAN LANDUYT, K.; YOSHIHARA, K.; GEEBELEN, B.; PEUMANS, M.; GODDERIS, L.; HOET, P.; VAN MEERBEEK, B. Should web e concerned about composite (nano-) dust? **Dental Materials**, v. 28, p.1162-1170, 2012.

VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C.; GRIMALT, R. Eccema de contacto alérgico: Fisiopatología. **DENTUM, Revista de Materiales Dentales**. Barcelona, v. 4, p.155-156, 2009.

VISALLI, G.; BALUCE, B.; LA MAESTRA, S.; MICALÈ, R.; CINGANO, L.; DE FLORA, S.; DI PIETRO, A. Genotoxic damage in the oral mucosa cells of subjects carrying restorative dental fillings. **Archives of Toxicology**, v. 87, p.179-87, 2013.

YAP, A.U.; HAN, V.T.; SOH, M.S.; SIOW, K.S. Elution of leachable components from composites after LED and halogen light irradiation. **Operative Dentistry**, v. 29, p.448–453, 2004.

YOON, T.H.; LEE, Y.K.; LIM, B.S.; KIM, C.W. Degree of polymerization of resin composites by different light sources. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, p.1165-1173, 2002.

ZHANG, Y.; WANG, Y. (A). The effect of hydroxyapatite presence on the degree of conversion and polymerization rate in a model self-etching adhesive. **Dental Materials**, v. 28, p.237-44, 2012.

ZHANG, Y.; WANG, Y. (B). Improved degree of conversion and polymerization of model self-etching adhesives through their interaction with dentine. **Journal of Dentistry**, v. 40, p.57-63, 2012.

Apêndices

Apêndice A – Nota da Tese

Efeito Protetor da Dentina Sobre Células Gengivais Quando em Contato com Materiais Poliméricos

Protector Effect of Dentin on Gingival Cells When in Contact with Polymeric Materials

A presente tese de doutorado produziu novo conhecimento em relação à influência protetora da dentina na viabilidade celular de células gengivais quando em contato com materiais poliméricos restauradores. É possível concluir como os fatores de crescimento que fazem parte da dentina facilitaram a viabilidade celular. Um dos achados principais foi aquele que demonstrou que o grau de conversão nem sempre tem relação com o grau de biocompatibilidade do material quando utilizado nas situações clínicas simuladas no presente trabalho. Da mesma maneira, a viabilidade celular de alguns dos materiais está provalmente relacionada com a forma na qual esses materiais interagem com a dentina.

Campo da pesquisa: Materiais Odontológicos, Dentística Restauradora, Patologia Bucal.

Candidato: Ricardo Alfredo Carrillo Cotto, Mestre em Odontologia, concentração em Materiais Dentários pela PUCRS (2003).

Data da defesa e horário: 24/02/2017

Local: Sala 54, andar térreo da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Rua Gonçalves Chaves, 457.

Membros da banca: Prof^a. Dr^a. Adriana Etges, Prof. Dr. Maximiliano Sérgio Cenci, Prof. Dr. Alexandre Severo Masotti, Prof. Dr. Josué Martos, Prof^a. Dr^a. Aline de Oliveira Ogliari, Prof. Dr. Fábio Garcia Lima (suplente) e Prof^a. Dr^a. Lísia Lorea Valente (suplente).

Orientador: Profa. Dra. Adriana Etges

Co-orientadores: Prof. Dr. Rafael Ratto de Moraes e Prof. Dra. Patrícia Santos Jardim.

Informação de contato: Ricardo Alfredo Carrillo Cotto, ricardo_cotto@hotmail.com.
Apêndice B – Súmula do currículo do candidato

Súmula do currículo¹

Ricardo Alfredo Carrillo Cotto nasceu na Cidade da Guatemala, Guatemala, em 03 de julho de 1965. Completou o ensino fundamental em escola privada e o médio em escola pública na mesma cidade. No ano de 1983 ingressou na Faculdade de Odontologia da Universidade de San Carlos da Guatemala (USAC), tendo sido graduado cirurgião-dentista em 16 de junho de 1989. No ano de 2001 ingressou no Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, área de concentração Materiais Dentários, sob orientação do Prof. Dr. João Mota Pacheco, tendo defendido sua dissertação em 18 de dezembro de 2002. No ano de 2013 ingressou no Doutorado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, área de concentração Dentística Restauradora, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Adriana Etges, tendo defendido sua tese em 24 de fevereiro de 2017. Durante ambos os períodos da Pós-Graduação foi bolsista da Coordenadora de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Publicações:

Influencia del tratamiento superficial en la resistencia de unión de una cerámica prensada a un cemento con base de resina. Gonçalves Motas, Eduardo; Carrillo Cotto, Ricardo; Silva Oshima, Hugo Mitsuo; Mayumi Hirakata, Luciana. Acta Venezolana. 2007.
