

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA

CITOTOXICIDADE DAS RESINAS FLUIDAS UTILIZADAS
PARA CICATRIZAÇÃO CIRÚRGICA: avaliação
***in vitro* em fibroblastos gengivais humanos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

VIVIAN APARECIDA MACHADO

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM ODONTOLOGIA

CITOTOXICIDADE DAS RESINAS FLUIDAS UTILIZADAS
PARA CICATRIZAÇÃO CIRÚRGICA: avaliação
***in vitro* em fibroblastos gengivais humanos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristela Dutra-Corrêa

VIVIAN APARECIDA MACHADO

São Paulo

2021

Machado, Vivian Aparecida.

Citotoxicidade das resinas fluidas utilizadas para cicatrização cirúrgica: avaliação *in vitro* em fibroblastos gengivais humanos / Vivian Aparecida Machado. - 2021.

15 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Biomateriais.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maristela Dutra-Corrêa.

1. Biocompatibilidade. 2. Toxicidade. 3. Enxerto gengival. 4. Fibroblastos. 5. Ferida cirúrgica. 6. Implante dentário. 7. Resina composta. 8. Resina fluida. 9. Tecido mole. I. Dutra-Corrêa, Maristela (orientadora). II. Título.

VIVIAN APARECIDA MACHADO

**CITOTOXICIDADE DAS RESINAS FLUIDAS UTILIZADAS
PARA CICATRIZAÇÃO CIRÚRGICA: avaliação
in vitro em fibroblastos gengivais humanos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristela Dutra-Corrêa
Universidade Paulista – UNIP - SP

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista – UNIP - SP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Ricardo Scarparo Navarro
Universidade Brasil – SP

DEDICATÓRIA

À minha família e ao meu filho Igor, meu motivo de viver, pelo apoio, incentivo, amor e paciência em todas as etapas da minha vida profissional.

Aos meus pais, Edevair Rodrigues Machado (*in memoriam*) e Maria Helena Machado, por tudo que puderam me proporcionar.

À Família Primavera, como costumo chamar minha equipe, pela paciência e incentivo para meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por toda oportunidade que tive em minha vida;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maristela Dutra-Corrêa, que me deu oportunidade de aprender e explorar novos conhecimentos, pela paciência e confiança na execução desse trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini e ao Prof. Dr. Sérgio Alexandre Frana, que não mediram esforços para a elaboração do experimento, no qual houve muito trabalho e algumas preocupações, momentos em que foram sempre solícitos e resolveram praticamente todos os problemas que apareceram no desenvolvimento do experimento, o meu muito obrigado; Agradeço em especial à Prof.^a Dr.^a Ivana, que teve muita paciência e colaboração, sempre retornando com minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Nilton De Bortoli Jr., pela oportunidade de conhecer a área acadêmica, o que me incentivou a buscar mais conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Zanatta, meu primeiro orientador, amigo, professor sempre presente nos ensinamentos, apoiando e ajudando.

Aos grandes amigos que levarei para a vida, André Marques Chanquini e Silvia Helena G. Braz, pelo incentivo e pela parceria em todos os sentidos, principalmente nesse momento tão especial, que encerra uma etapa importante de nosso crescimento profissional.

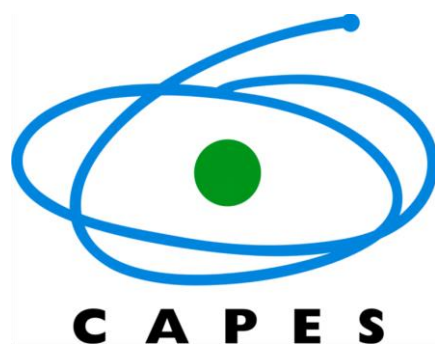
À toda a equipe de professores do mestrado Unip, pela experiência e por todos ensinamentos.

Ao Ipen – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

À CAPES, pela bolsa de estudo fornecida para que eu pudesse cursar esse programa com mais tranquilidade e empenho.

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

Meu agradecimento à CAPES/PROSUP pela bolsa recebida.



RESUMO

A resina fluida ou *flow* é uma resina composta que apresenta uma composição semelhante as resinas compostas convencionais, com quantidades reduzidas de carga e aumento da quantidade de monômeros ou diluentes, o que atribui maior citotoxicidade em comparação às resinas convencionais. Pouco se discute na literatura sobre as resinas fluidas, e principalmente sobre o uso dessas resinas diretamente nas feridas cirúrgicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade das resinas fluidas utilizadas para cicatrização cirúrgica: Avaliação *in vitro* em fibroblastos gengivais humanos. O delineamento experimental foi estabelecido da seguinte forma: Grupo Controle: **FGH** (fibroblastos gengivais humanos) mantidos em cultura sem tratamento. Grupos experimentais: **Z350**: Resina Filtek™ Z350 XT Flow (3MESPE, Brasil), **SF**: Resina Sigma Flow (DFL, Brasil), **OF**: Resina Opallis Flow (FGM, Brasil), **FMF**: Resina Fill Magic Flow (Vigodent, Brasil). Foram confeccionados discos de resina (6/grupo) com dimensão de 5 mm X 2 mm. A citotoxicidade foi avaliada a partir do contato direto com os fibroblastos gengivais humanos, para cada período de contato (24, 48 e 72 h). Ao final do experimento, as placas de 96 poços contendo os discos de resina foram corados por MTT e a densidade óptica foi avaliada com comprimento de onda de 562 nm. Podemos concluir que o tempo e a composição das resinas influenciaram na viabilidade celular. Todas as resinas apresentaram a diminuição da viabilidade celular nos tempos avaliados, porém, as mais tóxicas, Z350 e SF, apresentam os monômeros Bis-GMA e DMACr, reconhecidamente mais tóxicos, enquanto que a resina menos toxica, a FMF, não apresenta o monômero Bis-GMA. A partir dessa relação, uma avaliação risco-benefício deve ser realizada, em função da composição monomérica destas resinas fluidas, antes da aplicação direta sobre as feridas cirúrgicas.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Enxerto gengival. Ferida cirúrgica. Fibroblastos. Implante dentário. Resina composta. Resina fluida. Tecido mole. Toxicidade.

ABSTRACT

The fluid or flow resin is a composite resin that presents a composition similar to conventional composite resins, with reduced amounts of filler and increased amount of monomers or diluents, which attributes greater cytotoxicity compared to conventional resins. Little is discussed in the literature about fluid resins, and especially about the use of these resins directly in surgical wounds. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of the fluid resins used for surgical healing: In vitro evaluation of human gingival fibroblasts. The experimental design was established as follows: Control Group: FGH (human gingival fibroblasts) maintained in culture without treatment. Experimental groups: **Z350**: Filtek™ Z350 XT Flow resin (3M ESPE, Brazil), **SF**: Sigma Flow resin (DFL, Brazil), **OF**: Opallis Flow resin (FGM, Brazil), **FMF**: Fill Magic Flow resin (Vigodent, Brazil). Resin discs (6 / group) were made with a dimension of 5 mm X 2 mm. Cytotoxicity was assessed from direct contact with human gingival fibroblasts, for each contact period (24, 48 and 72 h). At the end of the experiment, the 96-well plates containing the resin discs were stained by MTT and the optical density was evaluated with a wavelength of 562 nm. We can conclude that the time and composition of the resins influenced cell viability. All resins showed a decrease in cell viability in the evaluated times, however, the most toxic ones, Z350 and SF, present the Bis-GMA and DMACr monomers, which are known to be more toxic, while the less toxic resin, the FMF, does not have the monomer. Bis-GMA. Based on this relationship, a risk-benefit assessment must be carried out, depending on the monomeric composition of these fluid resins, before direct application on surgical wounds.

Key-words: Biocompatibility. Composite resin. Dental implant. Fibroblasts. Fluid resin. Gingival graft. Surgical wound. Soft tissue. Toxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	9
2	CONCLUSÃO GERAL	12
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	13

1 INTRODUÇÃO GERAL

As resinas fluidas são amplamente utilizadas em procedimentos restauradores, e entre as principais indicações clínicas, estão restaurações diretas, forramentos, selante de fósulas e fissuras, reparo de restaurações indiretas e colagem de braquetes ortodônticos¹, porém, observa-se que a utilização das resinas fluidas diretamente sobre uma ferida cirúrgica vem aumentando. Na Implantodontia, tais resinas são utilizadas para a obtenção de bons resultados estéticos, através da aplicação de pequenas quantidades de resinas “*flow*” fotopolimerizadas, ao redor do pilar (*abutment*) para preservação do contorno dos tecidos moles^{2,3}. Já na Periodontia, elas são utilizadas atualmente para proteção da área doadora em cirurgias de enxerto de conjuntivo, nas quais outros materiais também são utilizados para proteção da ferida no palato⁴. É válido ressaltar que, embora as resinas compostas sejam biologicamente compatíveis, há evidências de efeitos alérgicos nos tecidos da mucosa bucal⁵, que parecem estar relacionadas com a matriz orgânica polimerizada⁶.

A resina composta é formada por uma matriz orgânica polimerizável, cargas inorgânicas e um agente união (silano) conectando as cargas e a matriz orgânica⁶. A matriz orgânica é formada pela junção dos monômeros e de moléculas com baixo peso molecular, que, através de uma reação química, convertem-se em polímeros⁷. Vários monômeros são utilizados⁸, e entre os mais comuns estão o Bis-GMA (dimetacrilato de bisfenol A glicol), o TEGDMA (dimetacrilato de trietileno glicol), o UDMA (uretano dimetacrilato)⁹ e o Bis-EMA (bisfenol A etoxilado dimetacrilato)¹⁰, que inclusive foram identificados como moléculas citotóxicas¹¹, exibindo propriedades tóxicas sistêmicas e locais, efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e alergênicos⁹.

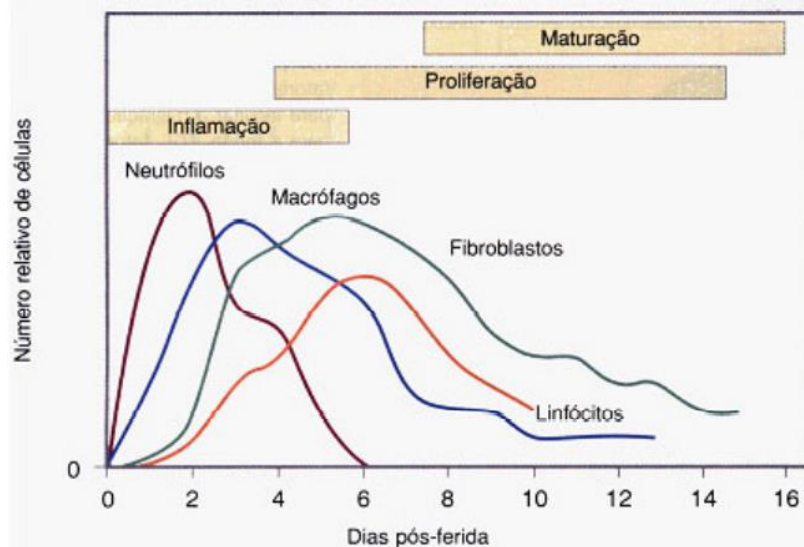
A resina fluida ou *flow* é uma resina composta de baixa viscosidade, baixa resistência e fotopolimerizável. Sua composição é, com frequência, a mesma de uma resina composta convencional, com exceção da porcentagem da carga, sendo reduzida para 37% - 53% (volume) em comparação com 50% - 70% (volume) das híbridas convencionais¹. Além disso, a resina fluida apresenta mais monômeros ou diluentes, permitindo maior fluidez, o que pode promover uma maior eluição dos monômeros residuais¹² e maior contração de polimerização quando comparada às resinas convencionais¹.

Pouco se sabe do uso das resinas fluidas diretamente sobre a mucosa bucal, porém, a liberação dos monômeros livres pode induzir mudanças morfológicas nas células, que apresentam papel crucial para a proliferação celular durante o processo de cicatrização de feridas^{13,14}. As resinas fluidas são mais citotóxicas que as convencionais¹⁵, sendo esse aumento na toxicidade atribuído à maior quantidade de diluentes ou monômeros presentes¹. A liberação de monômeros livres pode ocorrer em curto prazo, durante a conversão de monômero a polímero, ou a longo prazo, por meio da liberação de substâncias lixiviáveis geradas pela erosão e degradação, ao longo do tempo⁶. No entanto, sabe-se que a conversão monômero-polímero nunca é completa¹⁴, podendo liberar componentes tanto pela polimerização incompleta como por processos de degradação¹⁶.

Os testes *in vitro* da citotoxicidade envolvem a avaliação em culturas de células da atividade enzimática, integridade da membrana, alteração da morfologia celular, determinação da inibição do crescimento celular⁶. Vários métodos *in vitro* foram padronizados, utilizando-se culturas celulares, sendo o teste MTT o método mais utilizado⁶, escolhido por vários autores para avaliação da viabilidade celular^{17,18,19,20}. As células gengivais humanas são utilizadas a fim de testar a hipótese de que materiais restauradores dentários liberados podem atingir níveis tóxicos em tecidos orais humanos e podem induzir efeitos necróticos (inflamação), os efeitos de morte celular²¹. Uma das linhagem de células utilizadas corresponde aos fibroblastos gengivais humanos^{22,23}, que apresentam como função primordial a síntese de colágeno²⁴.

O processo cicatricial é comum em todas as feridas, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo²⁵. A reparação das feridas passa por três fases: inflamatória, proliferativa e maturação ou remodelação (Figura1)^{24,26}. Na fase inflamatória, iniciam-se a hemóstase e uma resposta inflamatória, com a migração de células, sendo os neutrófilos e os monócitos os primeiros a alcançarem o local da ferida, sendo os macrófagos aqueles que ativam os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização, tais como fibroblastos e células endoteliais²⁴. Na fase proliferativa, ocorre a proliferação de fibroblastos, movimento que dá início à síntese de colágeno (fibroplastia). Simultaneamente, ocorre a proliferação de células endoteliais com a formação de novos vasos (angiogênese) e com a formação de um tecido de granulação²⁷.

Figura 1 – Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases sequenciais do processo de cicatrização



Fonte: Tazima *et al.* (2008).

Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa²⁷, e na fase de maturação, a ferida sofre contração e cicatrização de forma desordenada devido à diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, estimulados por fatores de crescimento, e então, tem-se a remodelação tecidual²⁴.

Por fim, considerando o efeito tóxico das resinas fluidas, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade das resinas fluidas que estão sendo utilizadas diretamente na ferida cirúrgica, sobre fibroblastos gengivais humanos, *in vitro*.

2 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados mostraram que a viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos, FGH, expostas ao contato direto com resinas fluidas, teve influência do tempo de armazenamento e da composição das resinas fluidas na citotoxicidade. A viabilidade celular diminuiu em todas as resinas fluidas, nos tempos avaliados. As resinas fluidas mais tóxicas, Z350 e SF, são as que apresentam os monômeros Bis-GMA e DMACr, considerados os mais tóxicos entre os presentes, enquanto a menos tóxica, a resina FMF, não apresenta Bis-GMA, fato determinante para estimar os efeitos deletérios das diferentes resinas fluidas sobre as células da mucosa oral. Portanto, constata-se que os resultados obtidos com este trabalho dão suporte à avaliação do risco iminente da aplicação dessas resinas diretamente sobre uma ferida cirúrgica, em função de sua composição química.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Baroudi K, Rodrigues JC. Flowable Resin Composites: A Systematic Review and Clinical Considerations. *J Clin Diagn Res.* 2015 Jun;9(6):ZE18-24. doi: 10.7860/JCDR/2015/12294.6129. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26266238; PMCID: PMC4525629.
2. Ruales-Carrera E, Pauletto P, Apaza-Bedoya K, Volpato CAM, Özcan M, Benfatti CAM. Peri-implant tissue management after immediate implant placement using a customized healing abutment. *J Esthet Restor Dent.* 2019 Nov;31(6):533-541.
3. Hu C, Lin W, Gong T, Zuo Y, Qu Y, Man Y. Early Healing of Immediate Implants Connected With Two Types of Healing Abutments: A Prospective Cohort Study. *Implant Dent.* 2018 Dec;27(6):646-652. doi: 10.1097/ID.0000000000000809. PMID: 30119070.
4. Tavelli L, Ravidà A, Saleh MHA, Maska B, Del Amo FS, Rasperini G, et al. Pain perception following epithelialized gingival graft harvesting: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2019 Jan;23(1):459-468.
5. Sevkusic M, Schuster L, Rothmund L, Dettinger K, Maier M, Hickel R, et al. The elution and breakdown behavior of constituents from various light-cured composites. *Dent Mater.* 2014 Jun;30(6):619-31.
6. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig.* 2008 Mar;12(1):1-8.
7. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Phillips' science of dental materials. Elsevier, Ed. 12th ed. USA, 2013.
8. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998 Sep 5; 41(3):474-80.
9. Yesilyurt C, Yoldas O, Altintas SH, Kusgoz A. Effects of food-simulating liquids on the mechanical properties of a silorane-based dental composite. *Dent Mater J.* 2009 May;28(3):362-7.
10. Sideridou ID, Achilias DS. Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005 Jul;74(1):617-26.
11. Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991 Nov;70(11):1450-5

12. Tadin A, Marovic D, Galic N, Milevoj A, Medvedec Mikic I, Zeljezic D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013; 71: 923–929
13. Alshali RZ, Silikas N, Satterthwaite JD. Degree of conversion of bulk-fill compared to conventional resin-composites at two time intervals. *Dent Mater*. 2013 Sep;29(9):e213-7.
14. Chang HH, Chang MC, Wang HH, Huang GF, Lee YL, Wang YL, et al. Urethane dimethacrylate induces cytotoxicity and regulates cyclooxygenase-2, hemeoxygenase and carboxylesterase expression in human dental pulp cells. *Acta Biomater*. 2014 Feb;10(2):722-31
15. Al-Hiyasat AS, Darmani H, Milhem MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Investig*. 2005 Mar;9(1):21-5.
16. Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, et al. How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent Mater*. 2011 Aug;27(8):723-47. doi: 10.1016/j.dental.2011.05.001. Epub 2011 Jun 12. Erratum in: *Dent Mater*. 2013 Aug;29(8):919. PMID: 21664675.
17. Dutra-Correa M, Leite AABV, de Cara SPHM, Diniz IMA, Marques MM, Suffredini IB, et al. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *J Dent* 2018; 77:66–71.
18. Guzman RC, VandeVord PJ. Variations in astrocyte and fibroblast response due to biomaterial particulates in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Apr;85(1):14-24.
19. Jan YD, Lee BS, Lin CP, Tseng WY. Biocompatibility and cytotoxicity of two novel low-shrinkage dental resin matrices. *J Formos Med Assoc*. 2014 Jun;113(6):349-55.
20. Nascimento AS, Lima DB, Fook MVL, Albuquerque MS, Lima EA, Sabino MA, et al. Physicomechanical characterization and biological evaluation of bulk-fill composite resin. *Braz Oral Res*. 2018 Oct 25;32:e107.
21. Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K, et al. Toxicity potentiation by H₂O₂ with components of dental restorative materials on human oral cells. *Arch Toxicol*. 2008 Jan;82(1):21-8.
22. Janke V, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2003 Oct;82(10):814-8.
23. Urcan E, Scherthan H, Styliou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(8):2010-4.

24. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2008; 41 (3): 259-64.
25. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7 Suppl):1e-S-32e-S. doi: 10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9.
26. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2007;20(1):51-8.
27. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2005 Jan/Mar;41(1).