

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE SISTEMAS ADESIVOS CONVENCIONAIS COM DIFERENTES PROTOCOLOS DE APLICAÇÃO CLÍNICA

Daniela F. Maluf¹, Francielly F. De Freitas², Cintia F. De F. Bernardo²,
Camila N. De M. Ribeiro³, Yasmine M. Pupo⁴

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi comparar a resposta de fibroblastos da linhagem 3T3 induzida por substâncias lixiviadas ou dissolvidas a partir de sistemas adesivos convencionais de dois e três passos de aplicação por um método de cultura de células *in vitro*. Foram utilizados discos de papel de filtro estéril impregnados com cada sistema adesivo em estudo e fotoativados. Como controle negativo foi usado apenas o meio de cultura. Todos os discos foram colocados em meio de cultura RPMI, isento de soro e incubados por 24 h. Depois deste período, os eluatos foram recolhidos, filtrados e colocados em contato com as células fibroblásticas 3T3. A viabilidade celular foi determinada pela análise de atividade mitocondrial (MTT). A absorvância foi expressa em valores numéricos, que foram submetidos à análise estatística para determinar o efeito dos sistemas adesivos em estudo sobre a atividade mitocondrial das células. As médias obtidas a partir do ensaio de MTT foram calculados para os sistemas adesivos em estudo e transformadas em porcentagens, as quais representaram o efeito inibidor da atividade mitocondrial das células pelos eluatos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS e aplicando os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Não foi observada diferença entre os sistemas adesivos em estudo com relação à viabilidade celular, apesar de os mesmos apresentarem composições diferenciadas.

Palavras-chave: Adesão. Biocompatibilidade. Propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

The goal of this work was to compare the response of fibroblasts line 3T3 cells induced by substances based or dissolved from conventional adhesive systems of two and three steps of implementation for a method of cell culture *in vitro*. Sterile filter paper disks were impregnated with each adhesive system under study and then, photoactivated. As negative control, it was used just the culture medium. All discs were placed in RPMI serum-free culture medium, incubated by 24h and, after this period, the eluates were collected, filtered and placed in contact with fibroblastic 3T3 cells. Cell viability was determined by analysis of mitochondrial activity (MTT). The absorbance was expressed as numeric values, which were submitted to statistical analysis to determine the effect of adhesive systems in study on mitochondrial activity of cells. The means obtained from the MTT test were calculated for the adhesive systems and transformed into percentages, which represented the inhibitory effect of mitochondrial activity of cells by eluates. The statistical analyses were performed using SPSS and applying the nonparametric Kruskal-Wallis tests and Mann-Whitney. No difference was observed between the adhesive systems under study regarding cell viability, despite their differentiated compositions.

Keywords: Adhesion. Biocompatibility. Physico-chemical properties.

¹Farmacêutica-Bioquímica, Doutora em Ciências Farmacêuticas pela UFPR. Professora Adjunta dos Cursos de Biomedicina e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Acadêmica de Odontologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³Biomédica, Doutora em Ciências Biomédicas pela USP. Coordenadora do Curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁴Cirurgiã-Dentista, Doutora, Mestre e Especialista em Dentística Restauradora pela UEPG. Professora Adjunta de Dentística, Materiais Dentários e Clínica Integrada – Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

1 INTRODUÇÃO

Conceitos da Odontologia moderna têm sido baseados nas teorias de promoção de saúde, prevenção e estética. Muitos estudos têm tentado avaliar a importância dos adesivos dentais usados não apenas como agentes de união, mas também como protetores do complexo dentinopulpar (SILVA *et al.* 2013).

Os adesivos dentais são agentes intermediários utilizados durante a inserção de materiais restauradores para aumentar o contato destes e as paredes da cavidade dental preparada, contendo substâncias de base monomérica nas suas formulações, juntamente com outrassubstâncias, tais como solventes orgânicos, água, iniciadores e cargas inorgânicas (PORTO *et al.* 2010).

O uso de adesivos dentais em proximidade a polpa não é recomendável, devido aos efeitos deletérios provocados sobre o tecido. Entretanto, novos sistemas adesivos são frequentemente lançados com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas (LANZA *et al.* 2006; CAVALCANTI *et al.* 2010).

Diversos estudos tem demonstrado que os monômeros resinosos, como TEGDMA, HEMA, BIS-GMA e UDMA, tradicionalmente presentes na composição dos sistemas adesivos, têm citotoxicidade dependente do tempo e da concentração se utilizados em cavidades profundas ou em contato direto com o tecido pulpar. Estes monômeros podem comprometer as funções celulares básicas, tais como a proliferação, atividade enzimática, e respiração mitocondrial, também induzindo alterações na morfologia celular e integridade da membrana (BIANCHI *et al.* 2013).

Estudos tem mostrado que os sistemas adesivos autocondicionantes de 2 passos são menos ácidos e de agressividade leve ou moderada (pH 1,5 a 3,0). Já os adesivos de frasco único comparados a estes materiais demonstram ser mais ácidos, apresentaram hidrofília superior contendo maior quantidade relativa de solventes e diluentes em sua composição química (LANZA *et al.* 2006).

Componentes adicionais incorporados em sistemas adesivos e protocolos de aplicação seguindo tendências preconizadas pelo fabricante de unir monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única etapa de aplicação, na tentativa de fornecer simplificação da técnica, maior infiltração ao substrato e conseqüente resistência adesiva, podem alterar o comportamento biológico do complexo dentinopulpar se não incorporadas na rede de polímero. Além disso, podem ser liberados após a polimerização e difundidos através túbulos dentinários (ELIAS *et al.* 2015).

Uma vez que os sistemas adesivos disponíveis não são capazes de selar hermeticamente a dentina profunda, estes monômeros residuais, bem como outros componentes dos sistemas adesivos, podem penetrar através dos túbulos dentinários e alcançar a câmara pulpar, causando danos irreversíveis ao tecido celular, realizaram pesquisas com fibroblastos gengivais, a fim de observar a liberação de monômeros e o teor tóxico possivelmente dispensado. Foram utilizados

fibroblastos humanos removidos em cirurgia de rotina e concluíram que mesmo com menores quantidades de monômero, existe contaminação fibroblástica (ELIAS *et al.* 2015; FALCONI *et al.*, 2007).

O objetivo deste estudo foi comparar a resposta de fibroblastos 3T3 em cultura para substâncias lixiviadas a partir de sistemas adesivos convencionais de dois e três passos de aplicação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A resposta de fibroblastos da linhagem 3T3 induzida por substâncias lixiviadas ou dissolvidas a partir de sistemas adesivos comerciais foi analisada por ensaio em cultura de células de fibroblastos 3T3. Os sistemas adesivos avaliados foram: 1) “adesivo convencional de dois passos”: AM - Ambar (FGM, Joinville, SC, Brasil); 2) “adesivo convencional de dois passos”: SB - Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA); 3) “adesivo convencional de três passos”: SMP – Scotchbond MultiPurpose (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). Na Tabela 1 estão apresentados os fabricantes, a classificação e a composição dos sistemas adesivos em estudo.

Tabela 1- Materiais testados, classificação e componentes

Sistema Adesivo (Fabricante)	Classificação	Composição
Ambar (FGM Produtos Odontológicos)	convencional de dois passos	UDMA, HEMA, MDP, Monômeros ácidos metacrilatados, Monômeros hidrofílicos metacrilatados, Dióxido de silício silanizado Canforoquinona, Etil 4-dimetilaminobenzoato, etanol
Adper™ Single Bond 2 (3M ESPE)	convencional de dois passos	Bis-GMA, HEMA, ácido poliacrílico, ácido poli(itacônico), água, etanol, dl-canforoquinona, sílica (10%)
Adper™ Scotchbond™ Multi-Purpose (3M ESPE)	convencional de três passos	Solução aquosa de HEMA e copolímero do ácido polialcenóico

Bis-GMA: bisfenol A diglicidilmetacrilato; HEMA: 2-hidroxi etilmetacrilato; MDP: methacrilóiloxidecildiidrogenofosfato, UDMA: Diuretanodimetacrilato

2.1 Preparo do material

Discos de papel de filtro estéril (n=5) (papel de filtro qualitativo, 80 g, FITEC, Jandira, São Paulo, Brasil), com 5 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura foram impregnados com 10 mL de cada sistema adesivo em estudo e fotoativados por 10 s utilizando um fotopolimerizador diodo emissor de luz Valo (Ultradent Products, Inc., South Jordan, USA) com 1400 mW/cm² de intensidade de luz, avaliado com radiômetro. A ponta do aparelho fotopolimerizador foi colocada o mais próximo possível (cerca de 2 mm) do disco de papel sem tocá-lo. Discos do grupo controle (n=5) não foram impregnados com sistemas adesivos.

Todos os discos foram colocados, em triplicata, em placas de 12 poços (Corning Incorporated, Corning, NY) contendo 1 mL de meio de cultura RPMI isento de soro por poço

e incubadas durante 24 h em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, os eluatos (meio de cultura contendo componentes lixiviados dos sistemas adesivos) foram recolhidos e esterilizados por filtração em membrana filtrante de 0,22 µm.

2.2 Análise de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pela análise de atividade mitocondrial. Esta análise foi realizada utilizando o ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT. O ensaio de MTT envolve a conversão do MTT(3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), solúvel em água, para um composto insolúvel, osal de formazan. Em seguida, o formazan é solubilizado, e a concentração determinada por densidade óptica a 570 nm.

Uma garrafa de cultivo de células 3T3 foi tripsinizada e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI, contendo 20%SFB e soro fetal bovino e antibióticos penicilina/estreptomicina 100 mg/mL. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas em 1 mL de meio para determinação da contagem total de células viáveis.

O número de células viáveis totais foi quantificado em câmara de Neubauer pelo método do azul de tripan. A partir deste resultado, foi preparada uma suspensão celular de concentração 0,5x10⁵células/mL. A suspensão celular foi distribuída (100 µL/poço) em placas de 96 poços, que foram incubadas durante 24h em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C, para permitir a adesão celular. O meio RPMI (10% SFB+ antibióticos) foi aspirado e as células foram tratadas com os eluatos obtidos de cada material em sextuplicata e incubadas a 37°C/24h. Células tratadas somente com o meio de cultivo representaram o grupo controle. Após este período, o meio e eluatos foram aspirados e os poços foram lavados com 200µl de PBS estéril a temperatura de 37°Cem duplicata. Em seguida, foi acrescentado 100 µL/poço da solução do reagente MTT (Sigma-Aldrich) dissolvido em meio HBSS (0,5 mg/mL).

As células em contato com a solução de MTT foram incubadas a 37°C durante 4h. Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e substituído por 100 µL de DMSO puro em cada poço para dissolver os cristais de violeta de formazan resultantes da clivagem do MTT pela enzima SDH presente na mitocôndria de células viáveis.

A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria como sendo proporcional à absorvância medida a 570 nm de comprimento de onda com auxílio de leitor de microplacas (ELX 800, BioTek Instruments, Winooski, VE, EUA). Os dados de absorvância foram transformados em relação ao número de células viáveis (%) comparados ao grupo controle.

A média dos valores obtidos a partir das seis alíquotas foi calculada assim como o desvio padrão, que foram submetidos à análise estatística para determinar o efeito dos sistemas adesivos em estudo sobre a atividade mitocondrial das células.

2.3 Análise dos dados

As médias obtidas a partir do ensaio de MTT foram calculados para os sistemas adesivos em estudo e transformadas em percentagens, as quais representaram o efeito inibidor da atividade mitocondrial das células pelos eluatos. O controle negativo (meio de cultura) foi definido como tendo o metabolismo celular em 100%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS versão 21 e aplicando os testes não paramétricos Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Um limiar de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o efeito citotóxico dos adesivos sobre o metabolismo das células fibroblásticas 3T3, o tratamento com os diferentes adesivos forneceram respostas variáveis nas diferentes diluições testadas. O gráfico 1 mostra que o tratamento com os três adesivos resultou em morte celular de 43 a 46%, demonstrando um moderado efeito citotóxico dos sistemas testados. No entanto não houve diferença entre os sistemas adesivos em estudo ($p > 0,05$) com relação a viabilidade celular, apesar de os mesmos apresentarem composições diferenciadas.

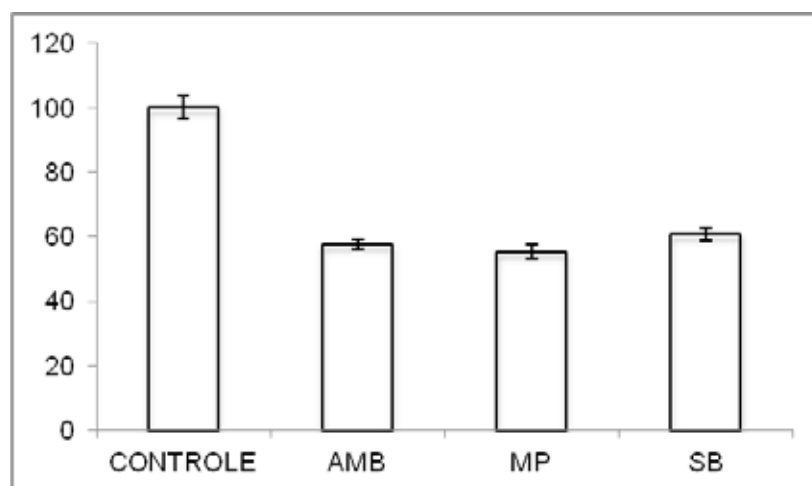


Gráfico 1- Porcentagem de viabilidade celular dos sistemas adesivos em estudo com relação ao grupo controle

Legenda: AMB (Ambar- 2 passos); MP (Adper Scotchbond Multi-Purpose - 3 passos) e SB (Adper Single Bond- 2 passos)

A citotoxicidade de sistemas adesivos odontológicos e seus componentes, têm sido investigado por meio de numerosas pesquisas *in vitro* (KAGA *et al.* 2001; COSTA *et al.* 2006; KOULAOUZIDOU *et al.* 2009).

Quando um novo sistema adesivo é desenvolvido, é imprescindível a realização de testes laboratoriais demonstrando a não toxicidade do material (MIYAGI *et al.* 2006; KOULAOUZIDOU *et*

al. 2009).

A avaliação da citotoxicidade de sistemas adesivos que utilizam discos de papel tem sido relatada e utilizada como uma análise prévia de baixo custo para uma primeira seleção de novas formulações (BIANCHI *et al.*, 2013).

Esta metodologia reproduz um desafio extremo de exposição das culturas de células aos componentes lixiviados, a partir dos materiais de teste (BIANCHI *et al.* 2013).

Desta forma, com o contato das células em eluatos, contendo componentes lixiviados dos sistemas adesivos é possível determinar quais os materiais que têm maior ou menor efeito citotóxico (BIANCHI *et al.* 2013).

A análise de cultura celular disponibiliza um método conveniente, controlável e reprodutível para testar a biocompatibilidade de materiais, quando comparado ao controle negativo, que não deve ter nenhum efeito sobre a viabilidade celular (VAJRABHAYA *et al.* 2009).

A citotoxicidade de materiais adesivos é avaliada pelo padrão de morte celular, porque as células apoptóticas são removidas por fagocitose, causando uma resposta inflamatória moderada, enquanto que a necrose pode causar uma resposta inflamatória mais grave e danos para os tecidos circundantes (BIANCHI *et al.* 2013; BIANCHI *et al.* 2013). Após esses testes, pode-se então direcionar os cuidados que devem ser tomados na utilização e aplicação desses materiais em procedimentos clínicos (COSTA *et al.* 2006).

Os sistemas adesivos tem a capacidade de impedir a infiltração bacteriana e selar cáries dentárias, as quais são tipicamente misturas complexas de monômeros de ligação cruzada e funcional diluídos em solvente orgânico. Contêm baixas concentrações de iniciadores e inibidores que regulam a reação da polimerização (CAVALCANTI *et al.* 2010; VAN LANDUYT *et al.* 2015). Devido à capacidade tampão de substrato, a dentina tem um efeito de proteção notável contra agentes tóxicos, o que permite neutralizar completamente os componentes ácidos, antes dos mesmos atingirem as células pulpares subjacentes (BIANCHI *et al.* 2013).

Devido às diferenças na composição química dos materiais e a interação dos seus vários componentes, com a estrutura da dentina, o dano potencial causado nas células podem variar, resultando em diferentes respostas no tecido pulpar. Os diferentes resultados de citotoxicidade para os adesivos de teste podem ser explicados pelas diferenças na sua composição química, propriedades reológicas e técnica de aplicação (PUPO *et al.*, 2013; PORTO *et al.* 2011).

O presente trabalho investigou a resposta de fibroblastos da linhagem 3T3 induzida por substâncias lixiviadas ou dissolvida a partir de sistemas adesivos convencional de dois passos, bem como adesivo convencional de três passos. Os resultados mostram que os tratamentos com os três adesivos resultaram em viabilidade celular que variou de 43 a 46%, demonstrando um moderado efeito citotóxico dos sistemas testados. No entanto não houve diferença entre os sistemas adesivos em estudo ($p > 0.05$), apesar de os mesmos apresentarem composições diferenciadas.

A toxicidade dos sistemas adesivos observada no presente estudo como demonstrado pelos resultados de MTT, resultou das diferentes composições químicas do componente adesivo que foi diretamente

relacionada com a presença moderada de monômeros residuais nos eluatos. Os monômeros residuais dos adesivos em estudo são: HEMA, Bis-GMA, MDP e UDMA. Bis-GMA têm um elevado peso molecular, e a sua estrutura química lhe confere algumas características, tais como, viscosidade, baixa volatilidade, baixa contração de polimerização, resultando em resinas adesivas mais rígidas com menor susceptibilidade aos meios hidrolíticos, com capacidade de mudar o ciclo celular e induzir o estresse oxidativo que conduz à apoptose e necrose de um modo dependente da concentração (PORTO *et al.* 2011; ELIAS *et al.* 2015). HEMA é um dos mais importantes componentes de materiais para restaurações dentárias. É um ingrediente comumente utilizado para melhorar a resistência de união à dentina e está presente em todos os adesivos avaliados no presente estudo.

Devido a sua estrutura química de baixo peso molecular, o HEMA é um monômero que tem maior facilidade de liberação numa solução aquosa (FALCONI *et al.* 2007; BIANCHI *et al.* 2013; ELIAS *et al.* 2015). Contém um grupo hidroxila com afinidade de ligação com hidrogênio, e pode difundir-se através do tecido da dentina em quantidades suficientemente grandes para causar danos pulpares irreversíveis (ELIAS *et al.* 2015).

Muitos dos monômeros amplamente usados na composição dos adesivos dentinários, tais como TEGDMA, Bis-GMA e UDMA são hidrofóbicos e não se difundem bem sob as condições aquosas encontradas *in vivo*. Quando usados em uma mistura com HEMA, a difusão desses monômeros pode ser facilitada, pois o HEMA aumenta a característica de hidrofilia do material. Sob estas condições, alguns monômeros hidrofóbicos podem atingir e lesar as células. Isto foi comprovado por Hanks *et al.* 1996, os quais relataram que a citotoxicidade *in vitro* de monômeros hidrofóbicos aumentou com a presença de HEMA na composição do material resinoso (LANZA *et al.* 2006). Todavia o HEMA continua sendo utilizado na formulação de sistemas adesivos sem causar problemas para o paciente, pois os materiais não são usados diretamente na polpa do dente exposta e quando utilizado em cavidades muito profundas é colocado uma proteção prévia (FONTES *et al.* 2012). Assim, nenhum sistema adesivo deve ser aplicado diretamente sobre o tecido pulpar, uma vez que isto resultaria em uma reação inflamatória intensa e persistente (ELIAS *et al.* 2015).

No estudo de Ratanasathien *et al.* (1995), avaliaram a citotoxicidade dos componentes de adesão a dentina em culturas celulares e descobriram que a classificação por toxicidade é de Bis-GMA > UDMA > TEGDMA > HEMA (menos tóxico) após 24 e 72 horas de exposição. No mesmo estudo, demonstrou-se que 0,00360 mM de HEMA reduziu o metabolismo celular em 50% após 24 horas de exposição. Já no estudo de Falconi *et al.* (2007), estudaram o efeito de concentrações tóxicas menores de HEMA em fibroblastos gengivais (hgfs), investigando modificação na morfologia celular, viabilidade celular e a influência em colágeno de proteína tipo I. Os resultados demonstram que 3 mmol/L de HEMA não induz a morte celular, mas causa uma modificação na morfologia de superfície hgfs e uma diminuição do sinal de colágeno de tipo I. Essas alterações podem ser uma consequência da atividade das células alteradas o que é responsável por danos às células.

No estudo de ELIAS *et al.* (2015), avaliaram a citotoxicidade direta dos sistemas adesivos convencionais, autocondicionantes e universais de acordo com o tempo de polimerização em

cultura de fibroblastos. Os autores observaram que apesar da maior complexidade da composição do sistema adesivo universal, sua resposta biológica não era a mais tóxica quando comparado com outros sistemas, mesmo quando o tempo mais curto de polimerização foi testado em cultura de células. A redução do metabolismo celular foi de cerca de 43-51% quando comparado com o grupo controle. Todos os sistemas adesivos avaliados apresentaram leve a moderada toxicidade, que foi relacionada com a presença de monômeros residuais nos eluatos a moderada. Entre os monômeros residuais mais comumente encontrados em eluatos são HEMA e Bis-GMA, que são componentes de todos os sistemas adesivos avaliados no presente estudo. A capacidade destes monômeros de alterar funções celulares e induzir o stress oxidativo leva a morte celular.

CONCLUSÃO

Esse estudo evidencia que para o efeito citotóxico dos adesivos sobre o metabolismo das células fibroblásticas 3T3, não houve diferença entre os sistemas adesivos convencional de dois passos comparado com adesivo convencional de três passos em estudo com relação à viabilidade celular, apesar de os mesmos apresentarem composições químicas diferenciadas.

REFERÊNCIAS

- BIANCHI, L.; RIBEIRO, A.P.; DE OLIVEIRA CARRILHO, M.R.; PASHLEY, D.H.; DE SOUZA COSTA, C.A.; HEBLING, J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v.101, n.8, p.1498-1507, 2013.
- BIANCHI, L.; RIBEIRO, A.P.D.; CARRILHO, M.R.O.; PASHLEY, D.H.; COSTA, C.A.S.; HEBLING, J. Transdental cytotoxicity of experimental adhesive systems of different hydrophilicity applied to ethanol-saturated dentin. *Dent Mater*, v.29, n.9, p.980-990, 2013.
- CAVALCANTI, B.N.; RODE, S.M.; MARQUES, M.M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*, v.38, n.8, p.505-509, 2010.
- COSTA, C.A.S.; HEBLING, J. Avaliação in vitro de sistemas adesivos de dentina aplicados sobre células odontoblastóides. *Rev Odontol UNESP*, v.35, n.1, p.97-106, 2006.
- ELIAS, S.T.; SANTOS, A.F.; GARCIA, F.C.; PEREIRA, P.N.; HILGERT, L.A.; FONSECA-BAZZO, Y.M.; GUERRA, E.N.; RIBEIRO, A.P. Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. *Braz Dent J*, v.26, n.2, p.160-168, 2015.
- FONTES, S.T.; FERNÁNDEZ, M.R.; OGLIARI, F.A.; CARVALHO, R.V.; MORAES, R.R.; PINTO, M.B.; EVANDRO, PIVA, E. Tetrahydrofuran as solvent in dental adhesives: cytotoxicity and dentin bond stability. *Clin Oral Invest*, v.17, p.237-242, 2013.
- FALCONI, M.; TETI, G.; ZAGO, M.; PELOTTI, S.; BRESCHI, L.; MAZZOTTI, G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Toxicol*, v.23, n.5, p.313-322, 2007.
- GODA T, ISHIHARA K. Soft contact lens biomaterials from bioinspired phospholipid polymers. *Expert Rev Med Devices*, v.3, p.167-174, 2006.
- HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*, v.12, n.3, p.186-193, 1996.

KOULAOUZIDOU, E.A.; HELVATJOGLU-ANTONIADES, M.; PALAGHIAS, G.; KARANIKA-KOUMA, A.; ANTONIADES, D. Cytotoxicity of dental adhesives in vitro. *Eur J Dent*, v.3, n.1, p. 3-9, 2009.

KAGA, M.; NODA, M.; FERRACANE, J.L.; NAKAMURA, W.; OGUCHI, H.; SANO, H. The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater*, v.17, n.4, 333-339, 2001.

LANZA, C.R.; DE SOUZA COSTA, C.A.; FURLAN, M.; AL CIO, A.; HEBLING, J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*, v.25, n.6, p.533-543, 2009.

LANZA, C.R.M.; J NIOR L.A.I.; SOUZA, L.B.; HEBLING, J.; COSTA, C. A.S. Inhibition of the odontoblast-like cells metabolism by self-etching adhesive systems. *Robrac*, v.15, n.40, p.23-33, 2006.

MIYAGI S.P.H.; MELLO I.; BUSSADORI S. K.; MARQUES M. M. Resposta de fibroblastos pulpaes humanos em cultura ao gel de papac ie. *Rev Odontol Universidade Cidade de S Paulo*, v.18, n.3, p.245-249, 2006.

MEI, N.; CHEN, G.; ZHOU, P.; Chen, X.; Shao, Z.Z.; Pan, L.F.; Wu, C.G. Biocompatibility of poly(epsilon-caprolactone) scaffold modified by chitosan—the fibroblasts proliferation in vitro. *J Biomater Appl*. v.19, p.323–339, 2005.

OZEN, J.; ATAY, A.; TOPÇU, F.T.; URAL, A.U.; DALKIZ, M.; TUNCA, Y.M. Analysis of the Cytotoxicity of Four Dentin Bonding Agents on Gingival Fibroblasts. *Turk J Med Sci*, v.35, p.395-399, 2005.

PORTO, I.; OLIVEIRA, D.; RAELE, R.; RIBAS, K.; MONTES, M.; DE CASTRO, C. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. *Dent Mater*, v.27, n.3, p.221-228, 2011.

PUPO, Y.M.; FARAGO, P.V.; NADAL, J.M.; ESMERINO, L.A.; MALUF, D.F.; ZAWADZKI, S.F.; MICHÉL, M.D.; SANTOS, F.A.; GOMES, O.M.M.; GOMES, J.C. An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*. DOI: 10.1080/09205063.2013.766784, 2013.

RATANASATHIEN, S.; WATAHA, J.C.; HANKS, C.T.; DENNISON, J.B. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*, v.74, p.1602-1606, 1995.

SILVA, J.M.F.; RODRIGUES, J.R.; CAMARGO, C.H.R.; FERNANDES V.V.B.; HILLER, K.A.; SCHWEIKL H.; SCHMALZ, G. Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives *Clin Oral Invest*. v.18, n.2, p.607-613, 2014.

VAJRABHAYA, L.; KORSUWANNAWONG, S.; BOSL, C.; SCHMALZ, G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.107, n.3, p.e86-90, 2009.

VAN LANDUYT, K.L.; KRIFKA, S.; HILLER, K.A.; BOLAY, C.; WAHA, C.; VAN MEERBEEK, B.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. Evaluation of cell responses toward adhesives with different photoinitiating systems. *Dent Mater*, v.27, pii: S0109-5641(15)00136-0, 2015.