

ADRIANO AUGUSTO MELO DE MENDONÇA

*Efeito citotóxico de diferentes materiais
dentários sobre células de linhagem
odontoblástica*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Mestre em Dentística Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

ARARAQUARA – S.P

2005

Adriano Augusto Melo de Mendonça

*Efeitos citotóxicos de diferentes materiais
dentários sobre células de linhagem
odontoblástica*

Banca Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre

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

2º Examinador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

3º Examinador: Prof. Dr. Wellington Dinelli

Araraquara, 23 de fevereiro de 2005

Adriano Augusto Melo de Mendonça

Dados Curriculares

Nascimento: 08/07/1976 – Belo Horizonte – Minas Gerais

Filiação: Luiz Augusto Mendonça

Maria de Lourdes Correa de Melo Mendonça

1997/2000: Curso de Graduação

Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas -

EFOA

2001-2003: Curso de Especialização em Dentística Restauradora

pela Faculdade de Odontologia de Araraquara –

UNESP

2003-2005: Curso de pós-graduação em Dentística Restauradora,

nível Mestrado – Faculdade de Odontologia de

Araraquara – UNESP

Dedicatória

Ao Senhor Deus Pai, que nos momentos de dúvida sobre a sua existência demonstrou, através de pequenos acontecimentos, a sua presença. Foi nos erros de cada experimento e na pronta solução de cada problema que Deus me mostrou sua constante permanência ao meu lado.

Ao meu amigo pai, Luiz Augusto Mendonça, exemplo de dedicação e amor à família, procurando sempre, através de seus esforços, assegurar o melhor para os filhos, mesmo nos momentos de grande dificuldade. Agradeço por todo suporte sentimental, que mesmo à distância, você tem me transmitido, através de palavras e orações. Quando não pôde estar ao meu lado, cedeu sua mão amiga. Obrigado Deus não somente pelo pai que tenho, mas por toda representação que ele o é para mim. Te amo muito.

À minha mãe serena, Maria de Lourdes, por ter me direcionado e demonstrado o caminho da humildade, paciência, perseverança e compreensão, quanto aos desafios que enfrento e enfrentarei durante a minha caminhada. Tais desafios são motivos de aprimoramento das qualidades e minimizadores dos defeitos humanos. Mãe, sem a sua característica de Maria, não saberia como fechar os olhos para determinadas situações e enfrentar outras de modo sereno e tranqüilo. Obrigado Deus por ter concedido a mim esta mãe sem igual.

Às minhas irmãs, Márcia, Valquíria e Patrícia, cada qual me cedendo sua parcela de qualidade, para que, junto a minha, pudesse arrancar forças para esta jornada. Graças as nossas ligações como irmãos e amigos que somos, foi a cada retorno ao lar que recarreguei as minhas energias quando na convivência com cada uma de vocês. Vocês não fazem idéia da importância que são para mim como irmãs.

À minha namorada, amiga e cúmplice, Fabrícia, que junto comigo vibrou, estimulou e concedeu a mim a oportunidade da minha ausência ao seu lado para, assim, vir realizar o meu grande sonho – ser mestre.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp, na pessoa da sua diretora Prof.^a Dr.^a Rosemary Adriana Chierici Marcantônio e do vice diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segala.

Ao orientador e amigo, Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, quem foi o responsável por me mostrar o verdadeiro significado da palavra ciência, da importância do planejamento científico e do trabalho em grupo. A minha admiração à sua pessoa não se resume apenas aos ensinamentos transmitidos, mas também pela sua humildade em aprender e repassar seus conhecimentos, igualmente às palavras de Paulo: “Se eu conhecer quanto se pode saber, e não tiver caridade, não sou nada.”

Ao meu amigo e sempre orientador Paulo Antônio de Arantes Vieira, pessoa pela qual sempre guardo admiração, pois despertou em mim a beleza da docência e do prazer de transmitir conhecimentos tanto clínicos quanto científicos.

À minha família de Araraquara, Oriana, Sr. Nilso, Sra. Darci, Tércio, Breno e Emiliano pela acolhida durante estes quatro anos de permanência em Araraquara.

Aos amigos e irmãos de Araraquara, Darlon, “Bictor” Gustavo e Rinaldo pela convivência, moradia e aprendizado em nossas “resenhas”. Muito obrigado por estarem presentes em Araraquara na mesma época em que estou.

A todos os amigos e amigas do Curso de Mestrado Carol do Piauí, Carol de Natal, Martin, Cláudia Huck, André, Hugo Moreno, Hugo Loiro, Neto e Renato pelo nosso encontro que, com certeza, tem muito significado.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa de Citotoxicidade e Biocompatibilidade de Materiais Dentários, Pedro, Kina Giovanni, Mariana, Edinho, Célia, Andreza, Daniela, Betinho, Júnia e Sabrina, junto com os quais aprendi os segredos da cultura celular e adquiri vários conhecimentos durante a minha estada no laboratório de Patologia Experimental.

Aos professores do Departamento de Dentística Restauradora, Marcelo Ferrarezi de Andrade, Maria Salete de Machado Candido, José Roberto Cury Saad, Osmir Batista Júnior, Sizenando de Toledo Porto Neto e Wellington Dinelli por terem me aceitado como aluno do Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora, área pela qual me apaixonei.

Às minhas ilustres amigas e sempre prontas a atender com sorriso estampado na face e abraço acolhedor, Donas Cidas, Adriana e Creuza que sempre me receberam como algo mais que aluno do curso de Pós-Graduação.

A todos que de forma direta ou indireta ajudaram na realização deste trabalho para que hoje pudesse alcançar o título de mestre.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	09
2. Revisão da Literatura	15
2.1 Monômeros resinosos.....	17
2.2 Cimento de ionômero de vidro.....	36
3.2 Hidróxido de Cálcio.....	52
3. Proposição.....	63
4. Material e Método.....	65
5. Resultado.....	77
6. Discussão.....	85
7. Conclusão.....	103
8. Referências Bibliográficas.....	105
9. Anexos.....	117
10. Resumo.....	119
11. Abstract.....	122

A 3D rectangular block, rendered in a dark gray color with a slight gradient and a shadow cast to the left. The word "INTRODUÇÃO" is written vertically in white, uppercase letters on the front face of the block.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

A matriz dentinária é sintetizada e secretada por células pulpares pós-mitóticas altamente diferenciadas, as quais são originadas a partir de células mesênquimais localizadas na periferia da papila dental (D'SOUZA, 2002). Cada célula mesenquimal indiferenciada origina outras células filhas por meio de sucessivas divisões celulares (mitoses) após serem induzidas por moléculas denominadas fatores de crescimento (BMP-2, BMP-4, TGF- β 1). A partir de então, as células da periferia da papila dentária tornam-se competentes e completamente diferenciadas em odontoblastos, tornando-se capazes de sintetizar e secretar componentes que caracterizam a matriz orgânica da dentina (D'SOUZA, 2002).

Durante a dentinogênese, fibrilas de colágeno e outros componentes da matriz intercelular, tais como lipídeos, fosfoproteínas, fosfolipídios e proteínas que contêm γ -carboxiglutamato são depositadas pelos odontoblastos primários a partir de seu movimento em direção ao centro da polpa dental (TEN CATE, 1998). À medida que realizam o movimento centrípeto com relação a papila dentária, prolongamentos citoplasmáticos são deixados atrás do corpo celular de cada odontoblasto, e passam a ser denominados de processos odontoblásticos. Assim, a matriz dentinária primária, que é depositada pelos odontoblastos em torno de tais processos faz com que a dentina, após sua mineralização, apresente característica tubular. Desta maneira, após a odontogênese, toda parede dentinária interna da câmara pulpar coronária e radicular passa a ser revestida por uma monocamada de células alongadas, denominadas de odontoblastos. Estas células, secretoras por natureza, reduzem o ritmo de síntese e deposição da matriz de dentina, caracterizando uma condição fisiológica de formação

da dentina secundária. É no interior dos túbulos dentinários que os processos odontoblásticos, fibras nervosas amielínicas, fluído dentinário e outros componentes específicos se encontram alojados e permanecem em íntimo contato, desempenhando papel fundamental na identificação de alterações, de variada intensidade, que venham a ocorrer sobre todas essas estruturas que compõem o complexo dentino-pulpar (MJÖR et al., 2001). Alguns estímulos resultantes de irritações ou agressões aplicadas sobre a estrutura dentária podem estimular os odontoblastos periféricos a sintetizarem uma matriz dentinária não fisiológica, denominada de dentina terciária (reacional).

Dentre muitos estímulos agressivos para o complexo dentino-pulpar, a inadequada utilização de brocas e/ou pontas diamantadas empregadas no desgaste do tecido dental, normalmente provoca desequilíbrio no perfeito relacionamento entre os componentes do complexo dentino-pulpar. Durante este procedimento clínico, restos de esmalte, dentina, prolongamentos citoplasmáticos do odontoblastos e outros componentes que se depositam sobre a superfície dentária caracterizam uma estrutura residual denominada “smear layer” (PASHLEY, 1984; BOWEN et al., 1984). Esta estrutura amorfa e de espessura variável recobre, mesmo que parcialmente, as paredes cavitárias, reduzindo significativamente a permeabilidade do tecido dentinário (PASHLEY et al., 1981; WATANABE et al., 1990). Desta forma, o íntimo contato entre materiais dentários específicos e a estrutura dentária fica comprometida, podendo determinar falhas na interface dente/restauração, comprometendo a viabilidade do procedimento operatório.

Foi com o intuito de alcançar íntimo contato entre dentina e materiais resinosos, estabelecendo adequada união micro-mecânica entre estas estruturas de diferentes características e origens, que foi sugerida a prévia remoção da “smear layer”

da superfície dentária, através da aplicação de soluções ácidas. Assim, o condicionamento ácido foi proposto com o objetivo de remover restos de componentes dentários que permanecem aderidos às paredes cavitárias (“smear layer”), ou no interior dos túbulos dentinários (“smear plugs”), após a preparação das cavidades, bem como promover a descalcificação superficial da dentina inter e peritubular. Este procedimento permite a interpenetração de componentes resinosos na área previamente descalcificada, resultando em importante adesão local, o que permite distribuição do estresse mastigatório, significativa redução da infiltração marginal, evitando o escurecimento das margens da restauração e recidiva de cáries (NAKABAYASHI et al., 1982). Todavia, pesquisas recentes têm demonstrado que o condicionamento ácido da dentina e posterior aplicação de agentes adesivos na área, especificamente em cavidades profundas, resulta em danos ao tecido pulpar (GWINNETT & TAY, 1998; HEBLING et al, 1999; COSTA et al, 2002). Nestas investigações foi demonstrado que o condicionamento ácido, além de remover smear layer e smear plugs, também descalcifica dentina peritubular, ampliando o diâmetro interno dos túbulos. Estes acontecimentos resultam em significativo aumento da permeabilidade dentinária. Conseqüentemente, a aplicação de agentes adesivos sobre dentina com alto conteúdo líquido e numerosos túbulos dentinários amplos, não permite adequada fotopolimerização do material resinoso. Assim, componentes residuais dos agentes adesivos podem se difundir através dos túbulos para alcançar o espaço pulpar (TAY et al, 1994; HEBLING et al, 1999). Muitas pesquisas têm demonstrado que a conversão de monômeros em polímeros, seja ela ativada quimicamente ou pela aplicação da luz visível, está diretamente relacionada com os efeitos citotóxicos de um determinado material como um todo (LEWIS et al., 1996; NALÇACI et al., 2004). Estudos têm

demonstrado que a reação de conversão dos monômeros em polímeros não ocorre de maneira eficiente, resultando na presença de moléculas de baixo peso molecular ou radicais livres que são gerados durante o processo de fotoativação (FERRACANE e CONDON, 1990). Muitos fatores, tais como presença de oxigênio e água (PAUL et al. 1999), podem interferir com a adequada polimerização do material restaurador (COSTA et al., 2003b). Assim, monômeros residuais livres parecem estar presentes em todos os materiais resinosos, sendo sua quantidade diretamente relacionada com o conteúdo de oxigênio local e presença de umidade da estrutura dentária. Desta maneira, tem sido demonstrado que mesmo monômeros residuais presentes em materiais restauradores podem se difundir através dos túbulos dentinários e alcançar o espaço pulpar (GERZINA e HUME, 1995; GERZINA e HUME, 1996).

De acordo com a histologia da polpa, os odontoblastos que revestem internamente a dentina são as primeiras células que entram em contato com estes monômeros residuais, os quais se mostraram altamente citotóxicos quando aplicados sobre células em cultura (HANKS, et al, 1991; RATANASATHIEN et al, 1995). Desta maneira, pode-se sugerir que determinados componentes resinosos, ao atingirem os odontoblastos em pesquisas *in vivo*, também podem determinar morte celular seguida de processo inflamatório crônico local. Assim, diferentes modalidades de tratamento do tecido dentinário relacionadas com o desenvolvimento de novos materiais odontológicos, têm sido propostos para evitar danos teciduais causados por materiais tóxicos que apresentam capacidade de difusão transdentinária.

Alguns materiais dentários, tais como os cimentos de ionômero de vidro Vitrebond™ e Rely X™ Luting e o cimento resinoso Rely X™ Unicem têm sido amplamente recomendados para diversos procedimentos operatórios, dentre eles

forramento cavitário e cimentação de peças protéticas inlays e onlays. A semelhança entre eles está no fato de que todos são aplicados diretamente sobre a estrutura dentinária sem condicionamento ácido prévio. Conseqüentemente, pode-se esperar que componentes destes materiais não tenham a capacidade de difusão através da dentina, prevenindo algum tipo de desconforto, ou dor pós-operatória associada a danos pulpares. Todavia, agentes químicos presentes na composição destes materiais podem interagir quimicamente com a dentina, alterando sua estrutura. Nesta situação especial, resíduos dos materiais poderiam se difundir para atingir a polpa, limitando a aplicação clínica destes produtos. Deve-se salientar que monômeros resinosos tóxicos também estão presentes no Vitrebond™, Rely X™ Luting e cimento resinoso Rely X™ Unicem.

Desta maneira, para avaliar amplamente a biocompatibilidade e citotoxicidade de um determinado material, indicando sua possível segurança de aplicação clínica para determinados procedimentos operatórios, uma série de testes preliminares *in vitro* são necessários (COSTA et al. 2003b; KLEINSASSER et al., 2004). Estes testes podem determinar a intensidade de liberação de componentes dos materiais em meio aquoso, se esta concentração dos componentes aumenta com o decorrer do tempo, e se tal concentração seria tóxica para células pulpares em cultura.

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar, de modo comparativo, o efeito citotóxico, sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23, de diferentes materiais dentários empregados em odontologia restauradora, os quais foram ma' por dois períodos experimentais em solução aquosa.



REVISÃO DA LITERATURA

2 Revisão da Literatura

1. Materiais Resinosos

Hanks et al. (1991) avaliaram a citotoxicidade de 11 componentes monoméricos encontrados na composição de resinas compostas sobre cultura de fibroblastos Balb/c 3T3. Para tanto, foi verificado se as concentrações inibitórias de todos os componentes resinosos sobre a síntese de DNA, síntese de proteínas e conteúdo total de proteínas. Além disso, os autores também procuraram verificar se a retirada dos componentes monoméricos dissolvidos em meio de cultura acarretaria em um efeito reversível quanto a todos os parâmetros propostos à avaliação. Os monômeros testados foram diluídos em DMSO para a obtenção de soluções estoques finais de cada monômero experimental. Em seguida, cada solução foi diluída na ordem de 1000 vezes em meio de cultura para assim alcançar a concentração final de DMSO igual a 0,1%, não influenciando nos ensaios de citotoxicidade. As células Balb/c 3T3 foram cultivadas em pratos de acrílicos na densidade de 15,000 células/well. Os componentes resinosos foram acrescidos 24 horas após o cultivo celular. A reversibilidade foi determinada pela remoção do meio de cultura contendo os monômeros experimentais dos wells e colocação de novo meio sem a presença dos mesmos por um período adicional de 24h. A atividade metabólica das células foi medida pela incorporação de Timidina tritiada [^3H -Trd], para avaliação do conteúdo total de DNA, e Leucina tritiada [^3H -leu], para avaliação da síntese de proteína, na quantidade de 20 μL em cada well. Para o ensaio de síntese de proteína, metade das alíquotas coletadas foram selecionadas para a cintilação líquida ao passo que outra

metade foi colocada em tubos de vidro para determinação total do conteúdo de proteínas. Os tubos para os ensaios de síntese protéica foram lidos em espectrofotômetro. Da mesma forma, para os ensaios de síntese de DNA, as alíquotas retiradas de cada well foram misturadas e colocadas em “vials” de vidro para cintilação líquida. A influência dos oligômeros de BisGMA sobre a síntese total de DNA não revelou diferença estatisticamente significativa entre células tratadas com $0,5\mu\text{mol/L}$ e células não tratadas ou células com presença de 0.1% de DMSO. Contudo, $5\mu\text{mol/L}$ de BisGMA diminuiu a síntese de DNA significativamente. Concentrações entre 10 e $25\mu\text{mol/L}$ apresentaram efeitos irreversíveis sobre a síntese deste ácido nucléico. Houve uma diferença significativa do grupo controle não tratado em termos de síntese de proteína total quando $0,5\mu\text{mol/L}$ de BisGMA foi depositado dentro dos wells por um período de incubação de 24h. Entretanto, este efeito foi reversível. Efeitos irreversíveis vieram a aparecer em concentrações entre 10 e $25\mu\text{mol/L}$. As concentrações de ID_{50} para BisGMA e TEGDMA variaram entre 10 e $100\mu\text{mol/L}$.

Jontell et al. (1995) avaliaram os efeitos causados por monômeros resinosos sobre células acessórias derivadas da polpa dental de rato. Segundo a metodologia, duas populações de células – células da polpa dental e células do baço (linfócitos) – foram submetidas a diferentes concentrações de monômeros resinosos dissolvidos em DMSO. Cada solução estoque foi diluída 1000x em meio de cultura para alcançar uma concentração final de DMSO a 0,1%, de modo a não interferir nos testes de citotoxicidade. Baços de ratos foram removidos assepticamente e colocados em meio de cultura devidamente suplementado. As células obtidas foram cultivadas a uma

densidade de $2,5 \times 10^5$ células/well em 200 μ L de meio de cultura. As células foram incubadas com os monômeros resinosos experimentais e meio contendo concavalina A, indutor de proliferação celular. Por outro lado, as células pulpares foram cultivadas a uma densidade de 10^4 por well. As concentrações dos monômeros experimentais foram determinadas com base em estudos prévios. Alguns monômeros resinosos - dentre eles BisGMA e TEGDMA - foram responsáveis pela diminuição da síntese de DNA de maneira dose dependente. Por outro lado, pequenas concentrações de UDMA, BisGMA, TEGDMA e BPA produziram um efeito estimulador sobre células do baço. Isto não foi observado para linfócitos T incubados com células da polpa dental conjuntamente.

Bouillaguet et al. (1996) determinaram a curva de dose-resposta para o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), quando em contato direto com células fibroblásticas da linhagem BALB/c no regime 3T3 *in vitro*. Dez concentrações de HEMA foram testadas (0,01 a 100 mmol/L) e solução salina fosfatada tamponada (PBS) foi utilizada como controle negativo. Diferentes concentrações de HEMA ou de PBS foram adicionadas à cultura de células BALB/c nos compartimentos de pratos de plásticos e incubados a 37°C em 5% de CO₂ e 95% de ar. Após os períodos de 12 e 24 horas, o método de análise colorimétrica do Metiltetrazolium (MTT) foi utilizado para avaliação da atividade metabólica celular. Para mensurar *in vitro* a difusão do HEMA através da estrutura dentinária, discos de dentina humana nas espessuras de 0,5 a 1,0 mm foram inseridos em câmaras de difusão, com pressão pulpar simulada por uma coluna de água que variou de 0 a 10 cm de altura. Diferentes concentrações de HEMA (80,150 e 375 mmol/L) foram inseridas na porção superior da câmara. Os

dados obtidos demonstraram que quanto maior a concentração de HEMA e maior o tempo de exposição, maior foi a redução da atividade metabólica das células BALB/c 3T3. O HEMA se difundiu rapidamente através da dentina e este processo foi dependente da concentração aplicada, entretanto não foi diretamente proporcional a esta. O aumento da espessura da dentina e a presença de pressão pulpar simulada determinaram a redução do coeficiente de permeabilidade do HEMA. Os resultados indicaram que o risco a citotoxicidade aguda pelo HEMA através da dentina é baixo, entretanto, alguns fatores como redução da espessura dentinária, a polimerização incompleta e o tempo de exposição prolongado podem contribuir para o aumento significativo deste risco.

McDougall et al. (1998) determinaram a utilidade de uma cultura de células de odontoblastos imortalizadas (MO6-G3) para teste de biocompatibilidade de materiais. Para tanto, o monômero TEGDMA foi empregado para avaliação da atividade mitocondrial de células MO6-G3 quando comparada a uma linhagem de células fibroblásticas já estabelecida. Assim, 1×10^3 células/well foram cultivadas em pratos de acrílico contendo 96 compartimentos e permitidas crescer em meio de cultura DMEM devidamente suplementado. As células foram expostas ao monômero resinoso TEGDMA em diferentes concentrações que variaram de 1×10^{-6} a $0,5 \times 10^{-3}$ M. Células não tratadas bem como células expostas ao DMSO foram incluídas em todos os ensaios. A citotoxicidade foi avaliada pela determinação da atividade mitocondrial utilizando a aplicação da técnica do MTT. A análise estatística por ANOVA utilizando o método de Tukey indicou efeitos tóxicos do TEGDMA para linhagem odontoblástica MO6-G3 em concentrações de 1×10^{-5} M. Por outro lado, o

monômero não produziu efeitos tóxicos sobre os fibroblastos L929 após 24 horas de incubação em todas as concentrações experimentais. Além disso, as células MO6-G3 expostas à concentração de $0,5 \times 10^{-3}$ foram incapazes de recuperar dos efeitos tóxicos gerados pelo tempo de exposição de 48 horas posteriores à remoção do monômero experimental. Odontoblastos expostos às concentrações de 1×10^{-4} e $0,5 \times 10^{-4}$ de TEGDMA recuperaram 40-50% e 75-80% da atividade mitocondrial, respectivamente, 48 após a remoção do monômero TEGDMA. A atividade respiratória das células L929 expostas a todas as concentrações experimentais de TEGDMA não foi diferente daquelas demonstradas pelo controle após 48 horas de remoção do monômero experimental.

Yoshi (1997) avaliou a relação entre toxicidade de monômeros resinosos e suas estruturas. Os monômeros hidrofílicos foram diretamente dissolvidos em meio de cultura ao passo que os monômeros hidrofóbicos foram misturados com polietilenosolbitol tetraoreato. Células HeLa foram cultivadas na densidade de 2×10^5 células/mL de EMEM em pratos de acrílicos contendo 12 compartimentos (wells) cada um. Decorridos 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido e 1 mL da solução de monômeros foi depositado sobre as células. O tempo de permanência das células em contato com os monômeros experimentais foi correspondente a 24 horas. O teste de MTT foi realizado para a avaliação da citotoxicidade dos materiais experimentais. O autor observou que todos os acrilatos foram mais tóxicos do que seus correspondentes metacrilatos. Em ambos, a presença do grupo hidroxil pareceu aumentar a toxicidade dos componentes. Com relação aos dimetacrilatos, os monômeros com quantidade igual ou inferior a 14 grupamentos de oxietilenos na

cadeia demonstraram similar toxicidade, ao passo que dimetracrilatos com 23 oxietilenos revelaram baixa citotoxicidade. Entretanto, o BisGMA demonstrou ser o monômero mais tóxico deste experimento.

Schedle et al. (1998) avaliaram o efeito citotóxico de compósitos dentais, adesivos, compômeros e cimentos pelos períodos de 1, 2 e 7 dias ou 6 semanas quando pré incubado em meio de cultura DMEM. Terminado cada período de incubação, o meio de cultura foi removido e os corpos-de-prova foram utilizados para o experimento. Todos os espécimes permaneceram em contato com as células pelo período de 72h. Em seguida, o número de células foi determinado por citometria de fluxo. Os resultados revelaram que os compósitos, os quais eram preparados e imediatamente colocados em contato com as células, apresentaram-se mais tóxicos. Por outro lado, os efeitos citotóxicos diminuíram a partir do aumento dos períodos de pré-incubação, passando a não serem significantes após 7 dias. A associação de resinas compostas com sistemas adesivos resultou em alta toxicidade, a qual era maior do que quando os compósitos eram utilizados sem o acréscimo do sistema de união.

Geurtsen et al. (1998) procuraram investigar a citotoxicidade de 35 substâncias identificadas em resinas compostas comerciais bem como comparar os seus efeitos citotóxicos sobre uma linhagem permanente e três linhagens primárias de células. Para tanto, todos os 35 componentes foram analisados segundo a sua pureza pelos métodos de espectrofotometria de alta precisão, cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa. Após análise de todas as substâncias experimentais, as

células do ligamento periodontal, gengiva inserida e polpa dental de pré-molares e molares humanos hígidos foram cultivadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade à temperatura de 37°C. Terminado o período de incubação das células com as substâncias testes, o conteúdo de DNA foi quantificado. Os valores de ED₅₀ (doses efetivas as quais diminuem em 50% as células viáveis em relação ao grupo controle) foram calculados. Segundo os resultados apresentados dentro do grupo dos (Co) monômeros, as substâncias mais tóxicas foram UDMA, BisGMA e BisEMA bem como DEGDMA e TEGDMA. Para o grupo onde foi analisado o efeito tóxico dos iniciadores/coiniciadores e inibidores, fotoestabilizadores, produtos de reação e contaminantes, as substâncias DMBZ, DMTDA e o inibidor BHT foram os que apresentaram os graus mais severos de citotoxicidade, respectivamente.

Costa et al., (1999) avaliaram o efeito tóxico de três sistemas adesivos dentais. Assim, células imortalizadas MDPC-23 foram cultivadas em pratos de acrílico contendo 24 compartimentos (wells), permitidas crescerem por 72 e, logo depois, contadas em microscópio de luz invertida. Adesivos não polimerizados foram aplicados ao meio de cultura para simular o efeito de adesivos na forma líquida. Os três sistemas adesivos foram aplicados por 120 minutos sobre as células para cada grupo: grupo 1) Single Bond, grupo 2) Prime & Bond, e grupo 3) Syntac Sprint. No grupo controle, solução tampão (PBS) foi adicionada ao meio. O número de células foi conferido novamente e a morfologia celular foi confirmada pela microscopia eletrônica de varredura. Além disso, os sistemas adesivos foram aplicados em filtros de papel de forma circular, polimerizados por 20s, e colocados na base dos 24 wells (seis wells para cada material experimental e grupo controle). As células MDPC-23

foram cultivadas no fundo dos wells e incubadas por 72 h. A área de inibição ao redor dos filtros de papel foi medida em microscopia de luz invertida; a morfologia celular foi avaliada sob MEV; e o MTT foi realizado para a respiração mitocondrial. Os adesivos na forma não polimerizada foram mais tóxicos para as células MDPC-23 do que aqueles adesivos polimerizados em papel filtro, quando comparado ao grupo controle. O efeito tóxico dos sistemas adesivos promoveu uma área de inibição ao redor dos papéis filtros, o qual foi confirmado pelo teste de MTT. No grupo controle, as células MDPC-23 apresentaram-se densas sobre o substrato plástico e mostraram-se em contato com os discos de papéis filtros. Nos grupos experimentais, quando o ácido dos sistemas adesivos foi removido por alteração do meio, ou quando o adesivo foi polimerizado, algumas células cresceram apesar dos efeitos tóxicos persistente. Todos os sistemas adesivos foram tóxicos às células MDPC-23. Ambos componentes ácidos quanto não ácidos dos sistemas adesivos foram responsáveis pelo alto efeito tóxico desses materiais.

Shajii et al. (1999) avaliaram o efeito do conteúdo de carga no interior de resinas compostas sobre a biodegradação de produtos derivados de dois modelos de resinas compostas. Os materiais experimentais foram baseados nos monômeros TEGDMA e BisGMA. Os compósitos foram produzidos utilizando concentrações de partículas de sílica com 20% e 40% em peso. As amostras foram incubadas com estearase colesterol e solução salina tamponada para 8, 16 e 32 dias. Produtos foram isolados por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) e identificados por espectrofotometria de massa. Os produtos identificados incluíam TEGDMA, 2,2-bis[4(2,3-hydroxypropoxy)-fenil]propano (bis-HPPP) e trietilenoglicolmetacrilato.

Bis-HPPP foi somente produzido na presença de enzimas. A quantidade isolada de TEGMA foi gerada pelos modelos com baixo conteúdo de cargas (compósitos -20), ao passo que os efeitos opostos foram observados entre 8 e 16 dias. Os dados indicaram que a biodegradação está diretamente relacionada com a proporção de partículas/resina, e sugere que este parâmetro deva ser considerado quando novos materiais forem desenvolvidos.

Hebling et al. (1999) procuraram avaliar a resposta do complexo dentino-pulpar à aplicação de um sistema adesivo em cavidades profundas preparadas em dentes humanos. Quarenta e seis cavidades classe V foram preparadas na superfície vestibular de pré-molares. O remanescente de dentina da parede axial foi condicionado com ácido fosfórico a 10% e sistema adesivo (grupo DA), ou recebeu hidróxido de cálcio antes da aplicação do ácido e sistema adesivo (grupo CH). Metade dos dentes, os quais receberam aplicação direta de ácido sobre a parede axial, foram contaminados anteriormente ao procedimento com placa coletada do próprio paciente (Grupo DAC). A placa foi colocada sobre a dentina por 5 minutos e então a cavidade foi restaurada. Todos os dentes foram restaurados com resina composta. Os dentes foram extraídos após 7, 30 ou 60 dias e preparados para análise em microscopia de luz. Os resultados mostraram que nos grupos DA e DAC, a resposta inflamatória foi mais evidente do que nos grupos CH. Também, a intensidade de reação pulpar aumento com a diminuição do remanescente dentinário. Não houve diferença significativa na resposta inflamatória entre os grupos DA e DAC. Baseado nas condições experimentais, foi possível concluir que o sistema adesivo All Bond 2, quando aplicado em cavidades profundas mostrou uma aceitável biocompatibilidade.

Todavia, a intensidade da resposta do complexo dentino-pulpar depende da espessura do remanescente dentinário.

Theilig et al. (2000) propuseram avaliar a influência de componentes de resinas compostas (TEGDMA e BisGMA), nas etapas do processo de cicatrização de tecido injuriado – proliferação e migração celular e reparo do tecido através da expressão de tenascina. Para tanto, fibroblastos de gengiva inserida (HGF) e queratinócitos humanos (HaCaT) cresceram em meio de cultura contendo antibiótico e soro fetal bovino, sendo assim mantidos em estufas umidificadas com 10% de CO₂ a 37°C. As substâncias testadas foram dissolvidas em etanol e acrescidas ao meio de cultura. A proliferação (BrdU) e migração celular foram determinadas 24 h após a incubação. A expressão de tenascina foi avaliada 4 e 7 dias após o tratamento com concentrações sub-letais de BisGMA e TEGDMA. Os dados indicaram que concentrações $\geq 0,25$ mM (TEGDMA) ou $\geq 0,01$ mM (BisGMA) significativamente inibiram a proliferação de ambos tipos celulares. A migração de queratinócitos humanos foi aumentada após incubação com BisGMA por 24 h. Por outro lado, a migração de HGF não foi alterada pela presença dos dois monômeros. Além disso, o TEGDMA não teve efeito sobre a expressão de tenascina ambas as linhagens de células. Após quatro dias de incubação, o BisGMA (0,01mM) significativamente reduziu a produção de tenascina pelos queratinócitos. Contudo, sete dias após o tratamento, BisGMA significativamente aumentou a expressão de tenascina de ambos tipos celulares. Os resultados indicaram que BisGMA pode afetar a migração de queratinócitos e alterar a expressão de tenascina da matriz extracelular. Assim, o

BisGMA pode significativamente influenciar no processo de cicatrização de tecidos orais.

Schweickl et al. (2001) verificaram a indução de mutagenicidade de compostos como BisGMA, TEGDMA, HEMA e UDMA através de testes que analisam fragmentos de cromossomos e o movimento destas moléculas (micronúcleos). Os autores também avaliaram a citotoxicidade daqueles componentes resinosos sobre fibroblastos V79 do pulmão de ratos. Anteriormente à análise da citotoxicidade e mutagenicidade de tais monômeros, todas substâncias experimentais foram analisadas quanto à pureza através de espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta precisão. Em seguida, os monômeros foram dissolvidos em DMSO e meio de cultura para posteriormente serem testados sobre as células. Estas, por sua vez, foram cultivadas a uma densidade de 5×10^3 células/ well em placas de acrílicos contendo 96 compartimentos. Os micronúcleos foram identificados como estruturas contendo DNA no citoplasma. Os resultados demonstraram que um aumento de micronúcleos foi observado de maneira dose dependente para TEGDMA, HEMA e GMA. Estes efeitos, contudo, foram reduzidos pela atividade metabólica da fração microsomal ativa do fígado de rato. Os dados revelaram que TEGDMA, HEMA e GMA induzem à formação de micronúcleos sob condições fisiológicas, *in vitro*, indicando atividade clastogênica (alterações cromossomais).

Engelmann et al. (2001) aplicaram a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução (RMNAR) para analisar as interações metabólicas causadas pelo TEGDMA e HMBP, monômeros importantes de materiais resinosos. Dessa

forma, fibroblastos 3T3 de ratos foram expostos a concentrações que variam de 0,001 a 5mM dos compostos experimentais. Em seguida, a proliferação celular foi determinada pelo emprego da sonda H33342 (marcador de DNA). Para a realização da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, as células foram cultivadas em pratos de cultivo tecidual com meio de cultura contendo concentrações de TEGDMA e HMBP que determinariam 20 % de viabilidade celular em relação ao grupo controle (ED₂₀). O conteúdo de proteínas e DNA das células tratadas e grupo controle não revelaram diferenças significantes na proliferação celular após incubação de 24 horas com concentrações ED₂₀ dos compostos TEGDMA e HMBP. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear de alta precisão (RMNAR) detectou TEGDMA em todas as frações celulares (lipídios, citosol e meio) ao passo que o HMBP foi observado exclusivamente na fração lipídica. Além disso, somente o TEGDMA afetou consideravelmente o metabolismo energético das células bem como causou redução dos níveis de glutathione.

About et al. (2002) avaliaram a influência dos monômeros resinosos na diferenciação de células pulpares em odontoblastos. Para isto, polpas de terceiros molares humanos foram cultivadas com β -glicerolfosfato (2mM). A região central da polpa foi utilizada para avaliar o efeito do TEGDMA, HEMA, UDMA e BisGMA sobre a diferenciação de fibroblastos pulpares em odontoblastos. O efeito dos monômeros foi estudado pela avaliação da expressão de genes específicos de odontoblastos. Na ausência destes monômeros, formação de nódulos minerais foi observada. Células pulpares, contribuindo para a formação de nódulos, sintetizaram colágeno tipo I, osteonectina e sialoproteína dentinária (DSP). Além disso, a

microscopia infravermelha transformada por Fourier mostrou que todos os minerais e composição orgânica dos nódulos foram característicos de dentina. Quando os monômeros foram adicionados ao meio de cultura em concentrações não tóxicas, o efeito do HEMA e BisGMA foram mais evidentes do que aqueles do TEGDMA e UDMA sobre a expressão de colágeno tipo I, osteonectina e DSP. Contudo, todos os monômeros significativamente diminuíram a expressão de DSP e completamente inibiram a formação de nódulo mineral.

Heil et al. (2002) propuseram comparar as respostas celulares frente a monômeros de materiais dentais, tais como TEGDMA, BisGMA e HEMA. Para isto, monócitos sanguíneos periféricos (PBMs) e uma linhagem celular estabelecida de monócitos (THP-1s) foram utilizados para este estudo. Os monócitos foram coletados de veias sanguíneas humanas e purificados para a obtenção de uma cultura constituída somente por essas células. Para o TEGDMA e o BisGMA, soluções de etanol foram preparadas junto ao meio de cultura de tal forma que a concentração final do solvente não alterasse o metabolismo celular. Por outro lado, em virtude de sua natureza hidrofílica, o composto HEMA foi preparado em uma solução aquosa concentrada de forma a adquirir a concentração desejada quando adicionada ao meio de cultura. O nível de toxicidade dos monômeros experimentais foi avaliado a partir do metabolismo celular (MTT) e secreção de TNF- α – indicador de atividade secretora de monócitos. Os resultados dos testes de citotoxicidade revelaram que os PBMs foram menos sensíveis aos materiais experimentais do que a linhagem contínua THP-1s. Independente da sensibilidade do tipo celular aos componentes testados, a ordem do material mais para menos tóxico não variou de uma linhagem para outra.

Mantellini et al. (2003) avaliaram o efeito de resinas adesivas sobre apoptose e o ciclo celular de odontoblastos (MDPC-23), células mesênquimais indiferenciadas (OD-21) e macrófagos (RAW 264.7). Todas as células foram expostas ao sistema adesivo Single Bond polimerizado pelos períodos de 0 a 40 segundos. Ensaio de Annexin V e iodeto de propídio demonstraram que o Single Bond induziu a apoptose de MDPC-23, OD-21 e macrófagos. A proporção de células apoptóticas foi dependente sobre o grau de polimerização de resinas adesivas. A morte celular induzida pela resina adesiva foi associada com a ativação de protease pró-apoptótica cisteína Caspase-3. Interessante que a maioria das células expostas ao sistema adesivo, as quais não sofreram apoptose, tiveram o seu ciclo celular interrompido. Com base nos resultados, os autores puderam concluir que a resina adesiva induz a apoptose e interrompe o ciclo celular das células que estão envolvidas na regeneração do complexo dentino-pulpar.

Janke et al. (2003) obtiveram fibroblastos gengivais para a avaliação de apoptose em presença de diferentes concentrações de TEGDMA. Após estabelecimento da cultura primária de fibroblastos e manutenção destas até alcançar a confluência, as células foram contadas através do teste de exclusão do azul de tripan para determinar a viabilidade celular. Anteriormente aos testes de apoptose e citotoxicidade, o monômero foi verificado quanto a sua pureza através da cromatografia líquida de alta precisão, cromatografia gasosa e espectroscopia de massa. O ensaio de citotoxicidade foi determinado através da contagem do conteúdo total de DNA com o uso da sonda intercalante de DNA Hoechst 33324TM. Para os

experimentos de apoptose, 5×10^5 células foram cultivadas em frascos de 75cm^2 com diferentes concentrações de TEGDMA. Além disso, na tentativa de obtenção de dados que pudessem revelar o tipo de morte celular (necrose e apoptose), as células foram coradas com Annexin V e PI e analisadas com citometria de fluxo. Em seguida, as células foram avaliadas quanto a ocorrência de apoptose, sendo analisadas através da microscopia invertida. Após a metodologia empregada, os gráficos puderam revelar que concentrações de 5mM e 7,5mM reduziram significativamente o crescimento de fibroblastos gengivais. Nas mesmas concentrações, os fibroblastos gengivais apresentaram alterações morfológicas indicativas de apoptose.

Kleinsasser et al. (2004) avaliaram o efeito genotóxico e citotóxico de materiais dentais sobre linfócitos humanos através do ensaio cometa. Este teste é utilizado para quantificar a quebra da cadeia simples de DNA. Os materiais experimentais investigados foram HEMA, TEGDMA, UDMA e BisGMA com *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine e dimetil sulfoxide como controles. A migração do DNA foi quantificada utilizando o momento da cauda do DNA sobre lâminas de vidro de acordo com Olive (OTM). A migração do DNA foi considerada ser elevada a níveis de OTM acima de 2. A citotoxicidade foi monitorada utilizando o ensaio do azul de tripan. No controle negativo, OTM variou entre 1,0 a 1,2. Com HEMA, as concentrações acima de 10^{-6}M , TEGDMA 10^{-3}M , Bis-GMA 10^{-4}M e UDMA acima de 10^{-6}M , relativas intensificações da migração do DNA (OTM>2) foram alcançadas. Concentrações maiores que $2,5 \times 10^{-2}$ que induziram a migração do DNA foram expressas pelo OTM de 3,3 para o HEMA, 4,5 para TEGDMA, 7,4 para o BisGMA e 2,8 para UDMA. Relativos efeitos citotóxicos foram também observados, mas níveis

de vitalidade foram críticos a uma variação de 71% para o BisGMA e 73% para o TEGDMA, somente.

Issa et al. (2004) avaliaram a alteração do metabolismo celular e integridade de membrana quando fibroblastos gengivais humanos foram incubados com variadas concentrações de monômeros resinosos. Depois de dissolvidos em DMSO, os monômeros foram acrescidos ao meio de cultura e incubados com as células em uma densidade de 5×10^3 células por um período de 24h. Os pratos de acrílicos contendo soluções de MTT e para determinação da liberação de lactato desidrogenase – indicador de integridade da membrana celular - foram lidos a um comprimento de onda de 570nm e 490nm, respectivamente. Após análise dos dados, o BisGMA apresentou-se mais tóxico do que todos os outros monômeros testados. Concentrações baixas de TEGDMA também revelaram diminuição do metabolismo celular e injúria da membrana plasmática quando incubados com células gengivais. Além disso, os autores puderam concluir que o ensaio de MTT foi mais sensível ao experimento do que o teste de avaliação da integridade de membrana celular bem como os resultados demonstraram importante relação entre a natureza do monômero quanto ao seu poder citotóxico.

Spagnuolo et al. (2004) procuram investigar o mecanismo molecular envolvido na citotoxicidade do monômero TEGDMA quando aplicado sobre cultura de células pulpares humanas. Para tanto, tecido pulpar de terceiros molares impactados humanos foram removidas de modo asséptico, cortadas em pequenos pedaços e incubadas em estufa de CO_2 a 37°C . As células foram cultivadas a uma

densidade de 1.5×10^5 células em pratos de acrílico mantidos em incubadora por 24 horas a 37°C . As células foram expostas a concentrações ascendentes (0 a 3 mmol/L) de TEGDMA para verificação da indução de necrose e apoptose. A partir daí, as células foram verificadas quanto ao tipo de morte celular que apresentavam através da citometria de fluxo. Concentração de 1mmol/L foi capaz de induzir grande quantidade de células ao processo de apoptose. Por outro lado, células em processo de necrose e apoptose foram observadas quando expostas a concentrações de TEGDMA igual a 2mmol/L. Além disso, inibição de fofatidilinositol 3 kinase foi inibida pela LY294002 amplificada quando as células foram induzidas a apoptose pelo TEGDMA.

Hirota et al. (2004) apresentaram diversas estratégias experimentais para reduzir o teor de monômero residual de copolímeros estireno/acrilato de butila produzidos em reações semicontínuas de polimerização em emulsão, que são amplamente utilizadas nas indústrias de papel e tinta. Estas estratégias envolvem a adição contínua de iniciador e/ou aumento de temperatura do reator durante a última etapa da reação, além da adição de um agente redutor e/ou um iniciador solúvel na fase orgânica. Verificou-se que a combinação adequada de diferentes técnicas pode levar a uma redução significativa no teor residual de monômeros no látex.

2. Cimentos de Ionômero de Vidro

Kanchanavasita et al. (1995) avaliaram o aumento de temperatura durante a reação de presa e as alterações dimensionais de cimentos de ionômero de vidro

convencionais (Fuji II, Opusfil) e modificado por resina (Fuji II LC), de um compômero (Dyract) e de uma resina composta (Silux Plus). As mudanças de temperatura durante a presa foram registradas por meio de um dispositivo acoplado a um termômetro digital. Cinco espécimes de cada material foram confeccionados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes e os materiais termo-ativados foram fotopolimerizados por 20, 30 ou 40 segundos. O cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC) demonstrou maior aumento de temperatura e taxas de contração superiores aos cimentos convencionais estudados. Em geral, o comportamento do Fuji II LC foi semelhante ao da resina composta, a qual exibiu rápido aumento na temperatura durante a exposição à luz, alcançando valor máximo em um período de tempo reduzido. Em seguida, com a remoção da fonte de luz, a temperatura decresceu imediatamente à temperatura ambiente. Os períodos prolongados de fotopolimerização não resultaram em aumento significativo da temperatura, mas estendeu o período de tempo antes da temperatura começar a declinar. A temperatura ambiente exerceu influência significativa na taxa de alteração dimensional de alguns materiais. A contração de polimerização dos materiais fotoativados foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura durante a reação de presa. Os resultados indicaram que as reações de presa de todos os materiais estudados foram exotérmicas e o cimento de ionômero de vidro modificado por resina apresentou o maior aumento da temperatura. Portanto, a indicação deste material em cavidades profundas deve ser estudada cuidadosamente quanto aos efeitos adversos sobre o tecido pulpar.

Schmalz et al. (1996) tiveram como objetivo avaliar, de modo comparativo, padrões de diferentes câmaras pulpares empregadas para testes de citotoxicidade de materiais experimentais. O dispositivo que simula uma câmara pulpar foi adquirido comercialmente para este experimento e comparado com outro dispositivo planejado e construído em laboratório. Os materiais Ketac-Fil, Ketac-Silver e Vitrebond, além de cimento de fosfato de zinco e óxido de zinco e eugenol, foram avaliados quanto ao seu potencial tóxico sobre células de linhagem fibroblástica L-929. Estas mesmas células foram cultivadas sob um disco de dentina bovina posicionadas no local correspondente ao espaço pulpar na densidade de aproximadamente 130 células/mm². Durante o cultivo celular, no local o qual receberia o material experimental, uma bolinha de algodão foi aplicada, evitando, assim, que qualquer fator pudesse prejudicar o crescimento celular. Para confirmação da viabilidade celular, as células foram coradas com diacetato de fluoresceína e contadas. Os materiais experimentais foram deixados em contato com o disco de dentina por um tempo de aproximadamente 24 horas. De acordo com os resultados, os menores valores de citotoxicidade foram alcançados quando o cimento de fosfato de zinco foi aplicado sobre o disco de dentina. Por outro lado, os cimentos convencionais, Ketac-Fil e Ketac-Silver, apresentaram valores intermediários de citotoxicidade. O cimento de ionômero de vidro, Vitrebond, juntamente com o óxido de zinco e eugenol demonstraram ser altamente tóxicos, matando todos os fibroblastos cultivados sob o disco de dentina. Ambos os dispositivos apresentaram resultados similares quanto ao desempenho para as pesquisas de nível primário.

Oliva et al. (1996) compararam a resposta de células osteoblásticas quando em contato com cimentos de ionômero de vidro que são indicados para reparo de tecidos ósseos. Os materiais experimentais foram: Ketac-Fill Aplicap, Ionocem Ionocap 1,0, GC Fuji II, GC Fuji II LC e Vitremer. Muitas características tais como eficiência no plantio, adesão e morfologia das células foram estudadas, bem como parâmetros bioquímicos específicos de osteoblastos, tais como produção de osteonectina. Diante dos dados coletados, os resultados obtidos indicaram que quatro dos cinco cimentos de ionômero de vidro testados foram biocompatíveis, mostrando células vitais aderidas à superfície dos materiais, proliferando e expressando marcadores fenotípicos dos osteoblastos, ao passo que o Vitremer, embora empregado no campo odontológico, exibiu grande efeito citotóxico para com as células. Os efeitos adversos dos cimentos de ionômero de vidro podem ser atribuídos a pelo menos dois compostos liberados da fase poliácida evidenciada pela ressonância magnética protônica (RMP), conhecida como HEMA e outras espécies acídicas não identificadas. A adição de puro HEMA nas mesmas concentrações encontradas pelos meios de RPM para as culturas de osteoblastos resultou em completa morte celular.

Lewis et al. (1996) avaliaram o efeito dos constituintes liberados de três cimentos de ionômero de vidro sobre o crescimento e metabolismo celular de células epiteliais orais. Discos de Ketac-Cem Radiopaco (KCR), Ketac-Cem Maxicap (KCM) e Fuji I foram incubados em meio Dulbeccos por 10 dias, com substituições diárias. Células da mucosa oral de Hamsters (HCP) foram incubadas em meio de cultura sem presença de componentes dissolvidos e meio contendo eluatos os quais foram adquiridos pela permanência do material experimental pelo período de 24

horas. O número de células foi determinado pelo ensaio colorimétrico de MTT, a síntese de DNA e RNA foi avaliada utilizando a incorporação de [³H] timidina e [³H] uridina, respectivamente. A resposta celular aos materiais foi determinada pela comparação do número de células e incorporação de radioisótopos (contagem por minutos de 1000 células). Resultados foram analisados por ANOVA e pelo teste de variação múltipla de Duncan, então convertidos para comparação de porcentagem. Os eluatos de todos os três materiais referentes as primeiras vinte e quatro horas de incubação inibiram o crescimento das células. O número de células expostas ao Fuji foi de 88% do grupo controle, enquanto aquelas expostas ao KCR e KCM foram de 58% e 59% do controle, respectivamente. A diferença entre as culturas expostas ao Fuji e controle foi significativa. A exposição das células aos dois cimentos Ketac foi diferente das células expostas ao Fuji e controle, mas não foi estatisticamente significativa entre eles. Todos os materiais causaram significativo aumento na marcação de DNA comparada aos grupos controle quando calculado sobre a porcentagem de células, porém os materiais não diferiram entre si. Ambos os cimentos Ketac também estimularam significativamente a marcação de RNA por porcentagem de células quando comparada ao grupo controle. Todos os efeitos dos materiais diminuíram com o passar do tempo. Os resultados sugeriram que componentes liberados dos materiais podem afetar a taxa de progressão de HPC células através do ciclo celular.

Hamid et al., (1998) identificaram e quantificaram alguns componentes liberados de sete cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina e compômeros. Vinte e um moldes cilíndricos de aço inoxidável com diâmetro interno

de 6 mm e profundidade de 1mm foi preenchido com um dos setes cimentos ionôméricos e compômeros, ativados por luz visível e, então, imediatamente imersos em frascos separados contendo água destilada. As amostras de soluções aquosas foram mantidas por um período de 30 dias e conservadas para análise. Uma cavidade oclusal de 6mm de diâmetro interno foi preparada em terceiros molares humanos extraídos, nos quais a dentina remanescente possuía 1.6-2.0 mm de espessura. Uma câmara de polipropileno foi unida à junção cimento esmalte de cada dente para conter 1 mL de água destilada. Dez dentes foram preenchidos com um dos três cimentos e ativados por luz visível. As amostras de soluções aquosas (eluatos) foram mantidas por um certo período de tempo para posterior análise em cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). Somente um componente, hidroxietil metacrilato (HEMA), foi detectado em ambos os eluatos contidos nas amostras dentais e nos moldes de aço inoxidável. A análise da difusão do HEMA através da dentina revelou um relativo deslocamento desta molécula para o interior da câmara pulpar nos primeiros dias, com exponencial declínio em diante. Os dados obtidos demonstraram que o HEMA foi liberado de todos os cimentos de ionômero de vidro fotoativados por luz visível e compômeros, tanto diretamente em água como através da dentina. Esta liberação pode ser relevante no sentido de risco tanto para o tecido pulpar como para possibilidades de reações alérgicas em pacientes.

Geurtsen et al. (1998) avaliaram a liberação de alguns componentes resinosos provenientes de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e compômeros. Os corpos-de-prova dos materiais experimentais foram confeccionados nas dimensões de 2mm de espessura por 5mm de diâmetro, os quais foram

polimerizados por um tempo de 60s a uma distância de 2mm do espécime. A partir disto, os extratos foram preparados para a análise em cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Outros espécimes com as mesmas dimensões foram armazenados em meio de cultura sem a presença de soro fetal bovino. Para o teste de citotoxicidade dos materiais, fibroblastos de linhagem contínua 3T3 foram cultivados em pratos de acrílicos com 96 wells na densidade de 1×10^4 células/well. A substância cloreto de difeniliodônio, fotoiniciador presente no material experimental Vitrebond, foi avaliado quanto à sua citotoxicidade. Logo após 24h de incubação, a viabilidade celular foi determinada com sonda intercalante de DNA H 33342. As análises da cromatografia gasosa e espectrometria de massa demonstraram que, vários componentes dos produtos testados foram liberados em meio aquoso, dentre os quais puderam ser reconhecidas TEGDMA, HEMA e canforoquinona. Quanto aos testes de citotoxicidade, tanto o cimento de ionômero de vidro Vitrebond quanto o compômeo Dyract Cem apresentaram efeitos severamente tóxicos às células em cultura.

Consiglio et al. (1998) propuseram a estudar o efeito de cimentos de ionômero de vidro convencionais (Baseline, Chemfil, Ketac-fill, Ketac Bond) e modificados por resina (Vitrebond e Vitremer) sobre a síntese de proteínas de fibroblastos gengivais bem como a atuação do pH do meio sobre as mesmas células no qual os espécimes ficaram armazenados. Os cimentos foram preparados segundo as recomendações do fabricante em moldes de vidro nas dimensões de 4 mm de altura por 8 mm de diâmetro. Além disso, os autores procuram verificar a influência da liberação de íons flúor em meio de cultura contendo os cimentos de ionômero de vidro Vitrebond e Ketac-fill. Os cimentos de ionômero de vidro incubados em meio

de cultura a diferentes intervalos de tempos determinaram uma rápida queda na síntese de proteínas nos 20 minutos iniciais, mantendo-se num platô constante até o tempo mais longo de exposição (60 minutos). De acordo com a intensidade de inibição da síntese de proteínas, os materiais testados puderam ser divididos em três grupos: grupo A (Ketac Fil e Chem Fil) – redução de 50%; grupo B (Baseline e Ketac Bond) – 75% de redução; e grupo C (Vitrebond e Vitremer) – completa inibição.

Leyhausen et al. (1998) tiveram como objetivo determinar e comparar a compatibilidade de cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina. Os materiais analisados foram: Ionoseal, Vitrebond, Compoglass e Ketac Fil Applicap, os quais foram preparados em corpos-de-prova com as dimensões de 2mm de altura por 5mm de diâmetro. Os materiais foram manipulados e polimerizados segundo as recomendações do fabricante. Assim, vários extratos de tais materiais foram obtidos em diferentes períodos e incubados com fibroblastos gengivais humanos (FGH) e fibroblastos de ratos (3T3). A viabilidade celular e determinação do DNA foi obtida pela coloração da cultura de células com a sonda HoechstTM 33342. O cimento Compoglass não inibiu o crescimento celular nos ensaios realizados. Os extratos dos cimentos Ionoseal e Ketac Fil não inibiram ou levemente inibiram o crescimento dos fibroblastos gengivais e de ratos, ao passo que o extrato do cimento ionomérico Vitrebond causou severas alterações nestas células. Além disso, o crescimento celular foi severamente ou totalmente inibido pelos extratos do Vitrebond. Com base nos resultados, os autores puderam concluir que o Vitrebond foi o material experimental mais citotóxico. Todos os demais materiais avaliados

revelaram excelente (Compoglass) ou boa (Ionoseal e Ketac Fil) compatibilidade celular.

Bem-Amar et al. (1999) avaliaram a alteração de pH de cimentos de ionômero de vidro convencional e cimentos de ionômero de vidro modificado por resina em intervalos curtos de tempo após a mistura, a fim de relacionar o tempo ideal de ativação sobre a acidez do material. Os materiais testados foram Vitrebond, Variglass e Fuji Lining LC comparados ao cimento tradicional Lining Cement. A fotoativação dos cimentos foi executada com intervalos de tempos diferentes após a manipulação do material experimental. A alteração de pH de cada material experimental foi avaliada imediatamente após a mistura e logo após, pelo tempo máximo de 8 minutos, com a utilização de PHmetro. Todos os materiais experimentais exibiram um aumento gradual do pH com o passar do tempo. A demora da fotoativação dos cimentos ionôméricos após a mistura não diminuiu significativamente a acidez do *liner* durante os primeiros 9 minutos após manipulação.

Palmer et al. (1999) avaliaram o efeito do grau de polimerização e maturação de espécimes sobre a liberação de HEMA de quatro cimentos de ionômero de vidro modificado por resina. Espécimes em forma de disco foram polimerizados pelo tempo recomendado pelo fabricante bem como sub e sobre expuseram os espécimes a fotoativação. Os espécimes alcançaram a presa no interior dos moldes à temperatura de 37°C, sendo, logo após o endurecimento, ou 10 min, 40 min ou 24 horas, imersos em água destilada por 4 horas. A liberação de HEMA foi determinada por HPLC de acordo com a concentração de HEMA em água armazenada. Vitremer, Fuji II LC e

Fuji Lining alcançaram a presa sem a presença de luz visível pelo tempo mínimo de 6 minutos e estes materiais liberaram baixos níveis de HEMA. O Vitrebond teve seu tempo de presa durante 15 minutos em escuro e a liberação de HEMA foi elevada, indicando que este material tem somente a reação ácido base. O HEMA liberado tanto do Vitremer quanto do Vitrebond não foi afetado pelo tempo de sub ou sobre exposição à luz visível ao contrário do que ocorreu com o Fuji II LC, o qual teve sua liberação reduzida com a sobre exposição. A sub exposição do Fuji Lining LC causou um significativo aumento na liberação do HEMA nas soluções de armazenamento. A fim de minimizar a liberação de HEMA, cimentos de ionômero de vidro devem ser polimerizados por pelo menos o tempo de recomendação do fabricante e nas espessuras não superiores àquelas também recomendadas.

Na tentativa de descobrirem os fatores responsáveis pela citotoxicidade induzida pelos cimentos de ionômero de vidro, Stanislowski et al. (1999) compararam o efeito tóxico dos cimentos de ionômero de vidro modificado por resina Photac-fil aplicap, Vitremer, Fuji II LC, Dyract, Compoglass e Hi-Dense sobre células pulpares. Além disso, os autores avaliaram, separadamente, a toxicidade de íons presentes nos cimentos ionoméricos bem como seus monômeros resinosos. Para os testes de citotoxicidade, células obtidas de polpas dentais de terceiros molares e segundo pré-molares foram cultivadas em pratos de acrílico com 96 wells. Decorridos 48h da presença dos materiais em meio de cultura, os eluatos foram aplicados sobre células pulpares, e aí permaneceram por um período adicional de 24h. A atividade da enzima mitocondrial foi avaliada como forma de avaliação do metabolismo celular. Os íons flúor foram demonstrados com a utilização de um eletrodo específico para tal

elemento. A presença de alumínio, estrôncio, zinco, prata e cobre foi determinada pela espectroscopia de absorção atômica. Para a identificação dos monômeros resinosos, tais como TEGDMA e HEMA, a espectroscopia de infravermelho transformada por Fourier foi utilizada. Para avaliação do pH, os eluatos foram diluídos nas concentrações de 10, 20 e 40%. Nos resultados obtidos, o Compoglass e Photac-fil mostraram-se menos tóxicos quando comparados aos outros materiais experimentais. Além disso, a toxicidade de todos os materiais foi eliminada no primeiro dia de incubação. Para os íons analisados, alumínio e o flúor não foram tóxicos em concentrações superiores a 1mM. Por outro lado, o zinco demonstrou alta toxicidade na concentração de 0,1mM. O estrôncio não revelou alta toxicidade em qualquer das concentrações testadas. Para os monômeros resinosos, a viabilidade celular aumentou consideravelmente quando os materiais foram tratados com etanol para obtenção dos eluatos. Quanto ao pH avaliado, para os eluatos não diluídos, somente Hi-Dense e Vitremer foram significativamente diferentes (5,9 e 6,3) do grupo controle (7,2 a 7,7). Contudo, após a diluição, o pH destes eluatos aumentaram para 7,1 e 7,4, respectivamente.

Nascimento et al., (2000) avaliaram a resposta pulpar de dentes humanos após o capeamento direto com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) ou com cimento de hidróxido de cálcio (Dycal). Dentes hígidos foram utilizados como controle. Cavidades classe V foram preparadas em 34 pré-molares humanos, nos quais o tecido pulpar foi exposto e capeado com materiais experimentais. Em seguida, as cavidades foram restauradas utilizando o adesivo dentinário Clearfil Liner Bond II e a resina composta Z100. Os dentes foram

extraídos após 5, 30, 120 ou 300 dias, e preparados para análise histológica. No quinto dia, o cimento de hidróxido de cálcio (HC) produziu uma grande zona de necrose de coagulação e sob a mesma, uma reação inflamatória mononuclear de intensidade suave à moderada. O Vitrebond (VB) causou uma resposta pulpar inflamatória de intensidade moderada e a formação de uma zona de necrose extensa. Ao longo do tempo, apenas o HC permitiu o reparo pulpar e a formação completa de ponte de dentina ao redor do local da exposição pulpar. Os componentes liberados pelo VB no interior da polpa dentária desencadearam uma reação inflamatória persistente, a qual foi associada com a ausência de formação da ponte dentinária. Após 30 dias, poucos cortes histológicos mostraram a presença de bactérias nas paredes dentinária. Nestas amostras, a resposta pulpar foi semelhante àquelas com ausência de microinfiltração. O VB foi mais irritante ao tecido pulpar do que o Dycal, o qual permitiu o reparo pulpar e a formação de ponte de dentina. Estes resultados indicaram que o VB não é um material apropriado para o capeamento pulpar direto de polpas humanas expostas.

Chang & Chou (2001) avaliaram a citotoxicidade do elemento flúor quanto à síntese de proteínas, atividade mitocondrial, proliferação celular e incorporação de sonda fluorescente H33258 para ensaio de citotoxicidade. Assim, o elemento flúor foi testado em variadas concentrações, alternando também o período de permanência deste elemento químico no meio de cultura. As células utilizadas para todos os ensaios foram adquiridas de polpa dental de segundos pré-molares extraídos por motivos ortodônticos. O teste de citotoxicidade medindo o conteúdo total de DNA demonstrou que concentrações de íons F^- são capazes de diminuir a densidade celular

de maneira dose e período dependentes. Concentrações de 20×10^4 mmol/L inibiram completamente a síntese de DNA. Concentrações acima de $2,5 \times 10^4$ mmol/L durante um período de cinco dias apresentou efeito inibitório na proliferação celular. Concentrações de flúor igual a 1mmol/L inibiram a síntese de proteína de maneira dose dependente. Concentração igual a 2mmol/L inibiram a síntese de proteína a 50% em relação ao controle. Da mesma forma, a presença dos íons F^- inibiu o metabolismo celular medido pelo teste de MTT. A liberação de flúor tem o potencial de gerar efeitos tóxicos às células da polpa.

Costa et al. (2003a) investigaram a citotoxicidade de cinco cimentos de ionômero de vidro, utilizando para isto parâmetros como metabolismo celular, contagem do número de células e análise da morfologia celular através de microscopia eletrônica de varredura. Os seguintes materiais experimentais foram testados: Grupo 1: Vitrebond (3M/ESPE); Grupo 2: Vitremer (3M/ESPE); Grupo 3: Fuji II LC (GC); Grupo 4: Fuji IX GP (GC); Grupo 5: Ketac-Molar (3M/ESPE). O grupo 6 (controle positivo) foi representado pela resina composta Z-100 sendo que o grupo 7 (controle negativo) foi representado pela solução tampão fosfato (PBS). Doze espécimes para cada material experimental, cujas dimensões eram 2mm de espessura por 4mm de diâmetro, foram preparados em forma circular e colocados no fundo de compartimentos esterilizados (wells). Todos os espécimes foram polimerizados pelo tempo de 40s. A intensidade de luz foi monitorada com o auxílio de um radiômetro durante todo experimento. Células MDPC-23 na densidade de 30,000 células/well foram cultivadas em pratos de acrílico contendo 24 wells cada um. Seis áreas representativas ao redor de cada material experimental foram selecionadas para a

contagem celular em microscópio de luz invertido. A atividade metabólica foi avaliada pela atividade de desidrogenase succínica. Os melhores resultados foram obtidos pelos grupos representados pelo Fuji IX GP (grupo 4) e Ketac-Molar (grupo 5). Estes materiais diminuíram o número celular em 29,5% e 32,5%, respectivamente. Além disso, ambos materiais reduziram o metabolismo celular em 40,3% e 42,5%, respectivamente. Para os grupos Vitrebond (grupo 1) e Vitremer (grupo 2) ocorreu redução no metabolismo celular de ordem 74,5% e 75,5%, respectivamente. Além disso, o número de células foi diminuído em 79,1% e 83,9%, respectivamente. O grupo 3 apresentou resultados intermediários. Os autores puderam concluir que tanto Vitrebond quanto Vitremer apresentaram severa toxicidade sobre as células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

Müller et al. (2003) demonstraram que o cimento de ionômero de vidro Vitrebond revelou apresentar um claro efeito genotóxico em testes de mutação gênica em células de mamíferos. Com células CHO bem como em bactérias umu-test com *Salmonella Typhimurium* TA1535/pSK1002 tanto os extratos de DMSO quanto o meio de cultura Ham F12 exibiram claro efeito citotóxico nos testes umu. O efeito é independente da extração do volume dentro da variação de 0,5 a 4 mL de meio de cultura. Subseqüentes extrações de Vitrebond não revelaram diferenças significantes na resposta genotóxica embora o peso e conteúdo de HEMA reduziram significativamente. Condições *in vivo* de Vitrebond foram simuladas por extrações de saliva artificial e saliva humana. Estes extratos demonstraram um claro efeito genotóxico no teste-umu, mesmo se somente em poucos segundos de tempo de

extração onde aplicados. A preparação das amostras para os testes de genotoxicidade reflete condições *in vivo* da aplicação do cimento de ionômero de vidro Vitrebond.

Soheili Majd et al. (2003) avaliaram o efeito protetor de dois antioxidantes (ascorbato e do trolox) contra os efeitos citotóxicos de materiais restauradores. Os biomateriais testados pertenciam a quatro grupos de materiais, dependendo de sua composição: (1) cimentos de ionômero de vidro: Ketac fil aplicap (ESPE) e GC Fuji II LC (GC Co.); (2) cimentos de ionômero de vidro modificados por resina: Photac-fil aplicap (3M/ESPE) e GC Fuji II (GC Co.); (3) resinas compostas: Z 100 MP (3M Dental Products) e Tetric Flow (Vivadent); (4) compômero: F2000 (3M dental products). Todos os materiais foram preparados em moldes cilíndricos cujas dimensões eram de 1,9mm de diâmetro por 1mm de profundidade. A fotopolimerização foi realizada de acordo com as instruções de cada fabricante. Os materiais foram armazenados em meio de cultura sem soro fetal bovino (“serum-free”) por um período de 72 horas. Logo após, os eluatos foram coletados e diluídos em concentrações onde pudesse encontrar o TC_{50} (porcentagem de eluatos que inibem 50% da viabilidade celular) de cada material. Os fibroblastos gengivais humanos foram semeados em pratos de acrílico contendo 96 wells na presença ou ausência de eluatos por um período de 24 h. O metabolismo celular foi analisado 24 h após o tratamento utilizando o teste de MTT. Em alguns experimentos, a viabilidade celular foi medida após o tratamento das células com os antioxidantes trolox e ascorbato, sendo este último avaliado em diferentes concentrações. Além disso, o conteúdo de glutathiona foi medido com a utilização do composto fluorescente monoclorobimane. A quantificação dos íons alumínio, ferro e cobre foi realizada pela espectrofotometria

de emissão atômica de plasma indutivo (EEAPI). O efeito da adição do ascorbato sobre as células incubadas com eluatos demonstrou uma diminuição do metabolismo celular de maneira dose dependente para os materiais F2000, cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e cimentos de ionômero de vidro convencionais. As duas exceções foram para as resinas Z100 e Tetric Flow, as quais não demonstraram qualquer alteração depois do tratamento com ascorbato. Também, o conteúdo da glutathione intracelular foi significativamente diminuído nos fibroblastos gengivais tratados com eluatos dos biomateriais na presença de ascorbato. Todavia, esta queda significativa de glutathione intracelular não ocorreu para os biomateriais Z100 e F2000. Quantidades apreciáveis dos íons metais alumínio e cobre puderam ser encontradas nos eluatos dos materiais de cimentos ionoméricos. O trolox exerceu efeito protetor para os fibroblastos gengivais tratados com eluatos dos seguintes materiais: Tetric Flow, GC Fuji II LC, F2000 e Z100.

Costa et al., (2003c) compararam as respostas de polpas de dentes de ratos capeadas com um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e um adesivo dentinário. Cavidades classe I foram preparadas nas superfícies oclusais de 54 primeiros molares superiores de ratos. O tecido pulpar foi exposto mecanicamente e capeado com Clearfil Liner Bond 2V (CLB), Vitrebond (VB) ou com pasta de hidróxido de cálcio (HC) como controle. Em seguida, as cavidades foram restauradas com amálgama. Após 7, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e os dentes processados para análise em microscopia de luz. Aos 7 dias, resposta inflamatória com necrose parcial do tecido foi observada para os materiais experimentais e controle. A reparação pulpar foi associada à formação de barreira mineralizada após

60 dias de terapia pulpar. Ambos materiais resinosos promoveram a deposição de fibrodentina rica em células no local da exposição pulpar, a qual foi mais extensa para as amostras do VB. Houve, também, formação de dentina terciária depositada por células pulpares alongadas sobre a matriz de fibrodentina. O tecido pulpar remanescente exibiu característica histológica de normalidade. No grupo controle, a reparação e a formação de ponte de dentina foram observadas após 30 dias. A desorganização do tecido pulpar ocorreu apenas na presença de bactérias. Os resultados indicaram que ambos agentes capeadores (Vitrebond e Clearfil Liner Bond 2V) permitiram reparação pulpar, a qual foi caracterizada pela síntese de fibrodentina rica em células e deposição de dentina terciária, as quais, em conjunto, caracterizam a barreira mineralizada formada adjacente à exposição pulpar.

Costa et al. (2003d) avaliaram a resposta do complexo dentino-pulpar de dentes humanos após aplicação de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) ou um sistema adesivo (One Step) em cavidades profundas. Cavidades classe V foram preparadas nas superfícies vestibulares de 26 pré-molares. No grupo 1, as paredes das cavidades foram condicionadas com ácido fosfórico a 32% e o sistema adesivo dentinário (One Step) foi aplicado. Nos grupos 2 e 3, antes do condicionamento ácido, as cavidades foram forradas com Vitrebond ou Dycal (cimento de hidróxido de cálcio), respectivamente. Todas cavidades foram restauradas com resina composta Z100. Os dentes foram extraídos nos períodos pós-operatórios de 5 e 30 dias e foram preparados para a análise em microscopia de luz. No grupo 1, a resposta inflamatória foi mais evidente que nos grupos 2 e 3. A difusão de componentes do material através dos túbulos dentinários foi observada apenas no

grupo 1, no qual a intensidade da resposta aumentou com a redução da espessura da dentina remanescente. A presença de bactérias foi evidenciada nas paredes laterais de duas amostras do grupo 2, onde não ocorreu resposta inflamatória ou desorganização tecidual. Baseado nos resultados, os autores concluíram que a aplicação do sistema adesivo One Step não é recomendada diretamente sobre a dentina em cavidades profundas. Nestes casos, as paredes das cavidades devem ser forradas com um material mais biocompatível como Vitrebond ou Dycal.

3. Cimentos de Hidróxido de Cálcio

Fitzgerald (1979) propuseram avaliar a seqüência inicial da reorganização celular após exposição pulpar e determinar se a síntese de DNA é um passo requerido na série de eventos que conduzem à diferenciação e reposição de odontoblastos na cura da polpa exposta. Sessenta e quatro cavidades de classe V preparadas em dentes de macacos foram divididas em quatro dentes por grupo, de acordo com os períodos que variavam entre o primeiro e o décimo quarto dia. Quatro dentes de cada macaco foram utilizados como controle. As cavidades foram preparadas na superfície vestibular de cada dente e as pontas diamantadas trocadas a cada quatro preparos realizados. As polpas foram mecanicamente expostas e, em seguida, os dentes foram capeados com Life (cimento de hidróxido de cálcio) e restaurados com amálgama dental. Timitidina tritiada foi injetada nos macacos horas antes de seu sacrifício. Logo após, todos os animais foram sacrificados e os dentes preparados para análise de microscopia. As polpas dentais foram divididas em quatro zonas, sendo duas superficiais e duas profundas. Os resultados demonstraram ter ocorrido um aumento

na síntese de DNA nas populações de células endoteliais e fibroblastos, a quais coincidiram com o aumento destas populações celulares quando observadas microscopicamente. Além disso, o aumento na atividade de fibroblastos sugeriram que estas células poderiam ser as responsáveis pela reposição dos odontoblastos perdidos junto à ferida pulpar.

Torneck et al. (1983) na tentativa de desvendarem algumas das propriedades do hidróxido de cálcio, propuseram avaliar o seu potencial mitogênico sobre células pulpares através da medida da síntese de DNA. Células pulpares foram obtidas de polpas de molares de porcos, as quais foram cortadas em pedaços menores, lavadas com PBS e mantidas em meio de cultura. As células entre a terceira e décima quarta passagem foram utilizadas para o experimento. A solução de hidróxido de cálcio foi devidamente preparada com 0,0121g deste sal, dissolvidos em 10mL de água destilada a 23°C. A solução foi agitada e centrifugada, tendo o seu sobrenadante filtrado em unidades de filtro de 0,22µm. O potencial mitogênico do hidróxido de cálcio sobre fibroblastos pulpares foi determinado pela absorção de trimidina tritiada ($[^3\text{H}]$ TdR). As células foram cultivadas em placas de Petri para cultura de tecido. O meio de cultura foi substituído por um novo meio de cultura acrescido de $[^3\text{H}]$ TdR na concentração de 1µCi/mL, a qual se manteve sobre as células em cultura. Três grupos foram assim definidos: grupo 1: 0,025mL de hidróxido de cálcio; grupo 2: 0,050 ml de hidróxido de cálcio; e grupo 3 não recebeu nenhum tratamento com tal solução. Todos os três grupos permaneceram incubados por um período de 18 horas. Os resultados demonstraram que 0,050 ml de solução de hidróxido de cálcio não

produziu efeito aparente sobre as células. Por outro lado, algumas concentrações de hidróxido de cálcio podem ser mitogênicas para fibroblastos pulpares.

Procurando avaliar as duas propriedades do hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 , Gordon et al. (1985) tratou polpas bovinas com diferentes soluções Ca(OH)_2 , variando o pH e concentração das soluções. Assim, depois de cada tratamento, os autores procuram avaliar a ação das diferentes soluções sobre a atividade enzimática e desnaturação de proteínas. As soluções experimentais de Ca(OH)_2 e Ba(OH)_2 foram preparadas com concentrações de 0,02M e 0,1M, respectivamente. Com a finalidade de averiguar o dano celular seguido pela exposição ao hidróxido de cálcio e hidróxido de bário, as atividades de desidrogenase láctica e fosfatase alcalina foram determinadas. As polpas dentais de dentes de boi foram excisadas e cortadas em pedaços de aproximadamente 1mm^3 . As polpas trituradas foram incubadas com soluções de diferentes molaridades e com distintos valores de pH, os quais para as soluções de hidróxido de cálcio variaram de 7,2 a 12,0 e uma solução de hidróxido de bário cujo valor de pH era de 12,3. Polpas não incubadas serviram como controle a fim de avaliar o efeito da não incubação. Após tratamento, o meio foi decantado e as polpas lavadas com água destilada e homogeneizadas com solução tampão apropriada para o ensaio enzimático. Com o propósito de verificar alguma alteração nas proteínas da polpa dental tratada com hidróxido de cálcio e hidróxido de bário, a análise em eletroforese foi realizada. Os resultados revelaram que os íons cálcio não são responsáveis pelas propriedades indutoras da solução contendo tal íon. Além disso, mudanças nas concentrações do íon não alteraram as atividades de fosfatase alcalina ou desidrogenase láctica. Por outro lado, os autores puderam verificar que

enquanto o íon cálcio não altera a atividade enzimática, o pH o faz. Além disso, o tratamento das polpas dentais, com soluções de hidróxido de cálcio, pareceu não alterar os padrões de eletroforese das proteínas solúveis pulpares quando comparadas com soluções salinas usadas como controle.

Schröder (1985) através de uma reunião de achados científicos pôde explicar o efeito dos agentes capeadores contendo hidróxido de cálcio na migração, proliferação e diferenciação de células pulpares. O autor revisou os efeitos desencadeados pelo cimento de hidróxido de cálcio sobre células pulpares bem como descreve os eventos no processo de reparação pulpar *in vivo*.

Hetem et al. (1989) avaliaram a biocompatibilidade de uma resina composta para dentes posteriores e de cimentos odontológicos, dentre os quais se encontrava o cimento de hidróxido de cálcio – Dycal. Segundo a metodologia empregada, germes de molares inferiores de embriões de ratos foram removidos no período de 14 ou 17 dias de gestação. As células coletadas compreendiam odontoblastos e ameloblastos em diferenciação, além de células pós-mitóticas, sintetizando matriz dentinária e de esmalte em estágio completo, respectivamente nos períodos de 14 e 17 dias de gestação. Os materiais foram testados dentro de uma das três formas seguintes: (1) discos contendo os materiais experimentais foram colocados em gel de colágeno logo abaixo da papila dental dos germes dos dentes; (2) alguns discos foram incubados dentro de vials de vidro com 1ml de meio Pratts a 37°C por 14 dias anteriormente à sua colocação no gel; (3) este meio contendo substâncias liberadas pelos materiais foi utilizado para cultivar os germes dentais. Em seguida, as amostras foram embebidas

em parafina e analisadas sob microscopia e luz. Os germes dentais do 17º dia de gestação pareceram ser mais sensíveis aos materiais experimentais do que as células dos germes dentais do 14º dia de gestação. O cimento de hidróxido de cálcio, utilizado como base para cavidades profundas, mostrou-se mais tóxico na forma de discos incubados do que em forma de eluatos.

Seux et al. (1991) propuseram verificar a influência do cimento à base de hidróxido de cálcio (Dycal) utilizado para capeamento pulpar, na diferenciação de células odontoblastóides de polpas humanas. Realizou-se a obtenção de microcristais de hidróxido de cálcio, os quais permaneceram sobre lâminas de vidro para cortes histológicos. As células da polpa humana de terceiros molares inferiores foram cultivadas e, posteriormente, colocadas juntamente com os microcristais provenientes do cimento de hidróxido de cálcio. A análise através da microscopia eletrônica de varredura, microsonda de raio X e difração de raio X revelaram a composição química e o estudo cristalográfico dos cristais. Como complementação dos dados deste estudo, procedimentos de imunohistoquímica foram realizados para a visualização de actina, tubulina, fibronectina, vimentina e colágenos tipo I e III. Os cristais analisados apresentaram predominantemente o composto cálcio em sua composição, não havendo alteração deste composto durante todo o experimento. A disposição destes cristais não teve nenhuma interferência nos processos biológicos envolvidos na diferenciação celular. Sob microscopia de luz, alterações no interior das células bem como no meio extracelular mostraram-se visíveis, como, por exemplo, forte coloração de colágeno tipo I ao redor do núcleo. Além disso, as células em contato com os microcristais sintetizaram fibronectina, a qual se mostrou

como uma fina rede ao redor dos compostos cristalinos. Algum início de polarização celular também foi visualizado nas células pulpares, características similares às aquelas observadas *in vivo*.

Murray et al. (2000), examinaram a citotoxicidade de dois sistemas adesivos, um cimento de óxido de zinco e eugenol, amálgama dental, quatro cimentos à base de hidróxido de cálcio e substâncias no seu padrão puro, tais como hidróxido de cálcio, ácido salicílico e sulfato de bário. Assim, para os testes de biocompatibilidade, todos os materiais foram avaliados de duas formas diferentes, porém ambas *in vitro*. No primeiro experimento, cavidades profundas foram preparadas e restauradas com dois produtos à base de hidróxido de cálcio disponíveis no mercado, antes da incubação em meio de cultura. Entretanto, no segundo experimento, os materiais experimentais foram colocados, em forma de pellet, sobre o complexo dentino-pulpar de 298 dentes fatiados, os quais foram posicionados em cultura para crescimento celular. Para tanto, 30 fatias de dentes contendo cavidades preparadas e 298 fatias de dentes com exposições pulpares foram seccionados com espessuras de 2mm. A análise histomorfométrica foi realizada para um grupo de células localizadas logo abaixo do local da preparação bem como em local distante a este. Para as áreas correspondentes às exposições pulpares, campos aleatórios foram escolhidos para contagem de três populações de células pulpares: odontoblastos, células da camada subodontoblástica e fibroblastos. Ao analisar a morfologia e número de células pulpares abaixo de cavidades profundas restauradas com produtos à base de hidróxido de cálcio, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre o grupo controle e os experimentais. Todos os materiais à base de hidróxido de cálcio apresentaram

padrões de destruição celular similar, contudo o padrão de destruição celular aumentou com o passar do período experimental. Para os demais materiais, a sobrevivência celular diferiu segundo o material testado além do aumento da destruição das células da polpa aumentar com o passar do tempo. Na sua formulação pura, o ácido salicílico e o hidróxido de cálcio mostraram ser as substâncias mais tóxicas seguidos pelo cimento de óxido de zinco e eugenol, amálgama com alta quantidade de mercúrio, Prime & Bond, Dycal, sulfato de bário, Hypocal, Scotchbond, Calasept, Life e One-step.

Demarco et al. (2001) avaliaram a biocompatibilidade de dois sistemas adesivos (Clearfil Liner Bond 2 e Scotchbond Multi-Purpose) e cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) quando aplicados em polpas dentais humanas e cultura de células. *In vivo*: vinte terceiros molares selecionados para extração foram utilizados neste estudo. Após a preparação das cavidades, a exposição pulpar foi alcançada com brocas carbide. O controle da hemorragia foi obtido com solução salina. Em dezesseis dentes, a polpa dental foi capeada com sistema adesivo e as cavidades foram seladas com resina composta. No grupo controle (n=4), a polpa dental foi capeada com Ca(OH)_2 e as cavidades foram seladas com IRM. Os dentes foram extraídos em 30 ou 90 dias seguintes ao tratamento e preparados para avaliação histológica e presença bacteriana. *In vitro*: materiais foram aplicados em placa de Petri, onde as células NIH-3T3 foram cultivadas. As células foram contadas 2, 4 e 6 dias após o cultivo para obter as curvas de crescimento e determinar a viabilidade celular. Todos os dados foram submetidos à análise estatística. Nos estudos *in vivo*, a formação de ponte dentinária foi visualizada em todos os dentes capeados com Ca(OH)_2 , sem

presença de inflamação. Resposta inflamatória moderada e formação de ponte dentinária foram visualizadas após 90 dias em cinquenta por cento dos espécimes tratados com Liner Bond 2. Polpas dentais tratadas com ScotchBond Multi Purpose apresentaram resposta inflamatória de moderada a severa, e a formação de tecido mineralizado foi detectada. Bactérias não estiveram presentes em nenhum espécime. Quando os materiais experimentais foram avaliados *in vitro*, a toxicidade foi similar entre os dois agentes adesivos, e ambos apresentaram efeitos citotóxicos estatisticamente elevados quando comparados com o hidróxido de cálcio. Por outro lado, o hidróxido de cálcio produziu a reparação da polpa dental em todos os dentes e exibiu baixo efeito tóxico do que os sistemas adesivos; contudo, a reparação da polpa dental também foi observada quando capeada com Liner Bond 2.

Costa et al. (2001) propôs avaliar o efeito citotóxico de soluções utilizadas para lavagem de cavidades, dentre as quais se encontrava a água de hidróxido de cálcio. Para tanto, células odontoblastóides na densidade de 30,000 células/cm² foram semeadas no fundo dos wells, os quais continham em sua base lamínulas de vidro para posterior análise da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As soluções experimentais foram preparadas adicionando 20µL dos materiais em 980 µL de meio de cultura DMEM. Estas soluções experimentais foram aplicadas sobre os odontoblastos. O número de células foi contado antes (grupo A) e após (grupo B) à colocação das seguintes soluções experimentais: água de hidróxido de cálcio Ca(OH)₂, peróxido de hidrogênio a 3% (H₂O₂), hipoclorito de sódio a 6% (NaOCl), Syntac Sprint (SS) (controle positivo) e solução tampão PBS-(controle negativo) sobre as células em cultura. Para complementação dos resultados, o teste de

citotoxicidade MTT foi realizado para avaliar o metabolismo celular pela atividade de uma enzima mitocondrial. Todas as soluções experimentais, com exceção da solução tampão (PBS), foram citotóxicas às células odontoblastóides. Na contagem celular, as soluções de H_2O_2 , NaOCL e SS foram responsáveis pela redução no número celular após a colocação dos materiais experimentais em meio de cultura. No ensaio de citotoxicidade (MTT), as mesmas soluções reduziram a atividade mitocondrial das células MDPC-23 e foram estatisticamente diferentes quando comparadas com as soluções de $Ca(OH)_2$ e PBS.

Murray et al. (2002) avaliaram as correlações entre eventos do capeamento pulpar e número de células odontoblásticas. Para isto, 250 dentes tiveram suas polpas expostas em cavidades preparadas em dentes de macacos de acordo com as regulamentações da ISO. As polpas expostas foram capeadas com hidróxido de cálcio e sistemas adesivos de frasco único e de dois frascos. Os dados foram submetidos a análise estatística utilizando a análise de variância. As variáveis correlacionadas ao número de odontoblastos foram a área de ponte dentinária, tempo desde de exposição pulpar, número de odontoblastos aos locais opostos à exposição, e materiais de capeamento pulpar. A área de formação de ponte dentinária esta diretamente relacionada ao número de odontoblastos, a atividade celular é tempo dependente, e o número de células é muito menor do que aquelas encontradas originalmente.

Rashid et al. (2003) analisaram o efeito do íon cálcio extracelular sobre a expressão gênica de proteínas ósseas de células pulpares humanas. Para tanto, polpas dentais foram extraídas de pré-molares humanos, os quais estavam indicados por

razões ortodônticas. As células foram mantidas em meio de cultura até alcançarem confluência e assim serem cultivadas em pratos para cultura de tecidos na densidade de 35×10^4 células/60mm. As células foram expostas a várias concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de magnésio (MgCl_2) por um período de incubação de 24h. Em seguida, o conteúdo de RNA foi extraído das células pulpare e quantificado por espectrofotometria a 260 e 280nm. Os produtos de PCR foram eletroforizados em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio, iluminados com luz ultravioleta e analisados por programa de imagem. Os resultados revelaram que os níveis aumentados de íons cálcio na concentração de 0.7mM induziram ao aumento de expressão de osteopontina e BMP-2. Contudo, os níveis de BMP-4 e fosfatase alcalina foram diminuídos na presença de meio de cultura com grande presença de íons Ca^{2+} .

Ribeiro et al. (2004) avaliaram os danos causados ao DNA celular por materiais endodônticos quando aplicados sobre culturas de células de linhagem contínua. Segundo a metodologia empregada, o ensaio do cometa e o teste de vitalidade, com azul de tripan, foram empregados para se obter os resultados da pesquisa. O hidróxido de cálcio, na forma de pó, bem como formocresol e paramonoclorofenol canforado não apresentaram efeitos genotóxicos sobre fibroblastos e células de linfoma de ratos.



PROPOSIÇÃO

3 Proposição

O presente trabalho teve como proposta avaliar o efeito citotóxico de diferentes materiais dentários recomendados para aplicação sobre o substrato dentinário, quando em contato com células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23. Também foi intuito desta pesquisa determinar se o tempo de incubação dos corpos-de-prova preparados com os materiais experimentais influenciaria em sua citotoxicidade.



MATERIAL E MÉTODO

4 Material e Método

1. Cultivo das células MDPC-23

Para avaliação da citotoxicidade dos materiais experimentais, foram utilizadas células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23.

As células foram descongeladas e semeadas em frascos de cultura esterilizados, com 75 cm² de área (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). O meio de cultura utilizado para manutenção das células foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (CULTLAB, Campinas, SP, Br), 100 UI/ml de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 2 mM/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células foram cultivadas em incubadora umidificada, na temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Passagens foram realizadas a cada três dias de tal maneira que 3x10⁴ células/cm² eram semeadas. Estes procedimentos foram repetidos até que se obtivesse o número adequado de células para execução do experimento.

2. Confecção dos corpos-de-prova

Neste estudo, foram avaliados quatro materiais dentários com indicação para aplicação direta sobre o substrato dentinário, sendo dois deles empregados para forramento de cavidades profundas e outros dois para cimentação de restaurações inlays, onlays e de coroas metálicas.

A composição de cada um dos materiais experimentais, bem como seus respectivos fabricantes, proporção pó/líquido (em peso) utilizada no experimento, e o tempo de fotoativação empregado, estão demonstrados na Tabela 1.

Pratos de acrílico com 24 compartimentos individualizados (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) foram utilizados neste experimento. Em todos os compartimentos, foi aplicado 1,1 mL de meio de cultura não suplementado com soro fetal bovino (MC-SFB), uma vez que investigações prévias (TAKEDA et al., 1993) afirmaram que componentes liberados de materiais resinosos podem interagir com constituintes do SFB, interferindo, assim, nos resultados de pesquisas de citotoxicidade em cultura de células.

Então, dez corpos-de-prova de cada material experimental foram confeccionados em matriz de polietileno nas dimensões de 2mm de espessura por 4mm de diâmetro (Figuras 1 e 2). Antes da remoção dos materiais quimicamente ativados do interior da matriz, foi aguardado o tempo de 2 a 3 min. para o Hydro C (HCa) e de 10 min. para o RelyX Luting (RL), até que se alcançasse o endurecimento final dos produtos. Por outro lado, os demais materiais experimentais, RelyX Unicem (RU) e Vitrebond (VB), foram fotoativados através da aplicação de luz visível (Curing Light 3000 XL, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) pelos períodos de 20 seg. e 30 seg., respectivamente. A intensidade de luz emitida pelo aparelho fotoativador ($410\text{mW}/\text{cm}^2$) foi monitorada durante todo o experimento através de um radiômetro (Optiluz 500, Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA).

Tabela 1. Apresentação dos materiais experimentais demonstrando seus fabricantes, composição, proporção pó/líquido e tempo de fotoativação. FOAr, 2005

Nome Comercial (Fabricante)	Composição	Preparação dos Materiais	Tempo de Polimerização/presa
Hydro C (Dentsply)	<p><u>Pasta Base:</u> Éster glicol salicilato, fosfato de cálcio, tungstato de cálcio, óxido de zinco e corantes minerais.</p> <p><u>Pasta Catalisadora:</u> Etiltolueno sulfonamida, hidróxido de cálcio, óxido de zinco, dióxido de titânio, estearato de zinco e corantes minerais.</p>	Proporções iguais de pasta base e catalisadora	2 a 3 min.
Vitrebond (3M/ESPE)	<p><u>Pó:</u> cristais de fluoraluminosilicato (pó de vidro) - > 95%; cloreto de difeniliodônio - < 2%.</p> <p><u>Líquido:</u> ácido polialquenóico (copolímero do Vitrebond) – 35-45%; 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) – 20-30%; água – 30-40%.</p> <p><u>Pó:</u> vidro de silicato de flúor-alumínio 90 - 100%</p>	Pó/líquido: 1,4 / 1,0 em peso	30 seg
RelyX Luting (3M/ESPE)	<p><u>Líquido:</u> água – 30-40%, ácido policarboxílico e ácido itacônico – 30-40% e hidroxietil metacrilato (HEMA) – 25-35%</p> <p><u>Pó:</u> partículas de vidro silanizada, sílica sinalizada, hidróxido de cálcio, persulfato de sódio, pirimidina substituída.</p>	Pó/líquido: 1,6:1,0 em peso	10 min
RelyX UNICEM (3M/ESPE)	<p><u>Líquido:</u> ésteres de ácido fosfórico metacrilados 40-55%, Trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA) 27-38%, substituintes de dimetacrilatos 27-34%</p>	Cápsulas Pré-dosadas	20 seg

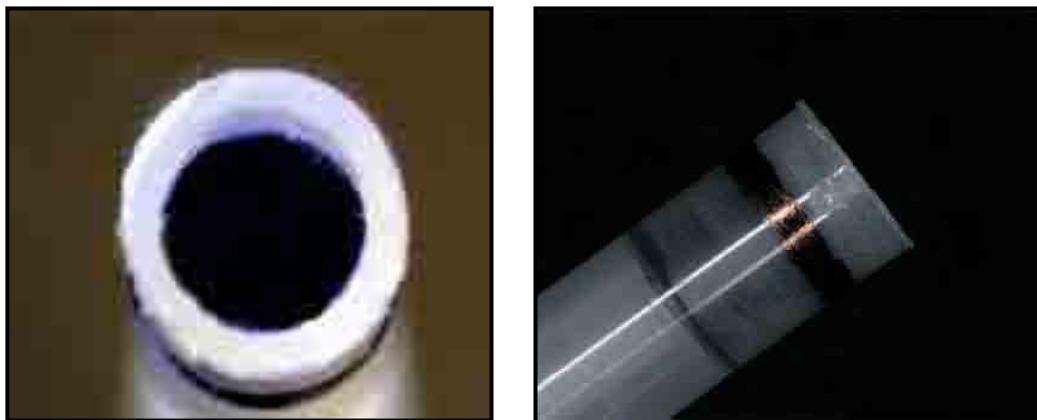


Figura 1: Vista frontal da matriz de polietileno, onde se pode observar o espaço para inserção do material experimental de tal maneira a obter corpos-de-prova circulares.

Figura 2: Vista lateral da matriz de polietileno caracterizando a espessura em que os corpos-de-prova apresentariam após sua preparação.

Logo após a inserção dos materiais experimentais no interior da matriz de polietileno, uma lâmina de vidro com 1mm de espessura foi posicionada sobre a extremidade aberta desta matriz (Figura 3). Para os materiais ativados pela ação da luz visível, a ponta ativa do aparelho fotoativador foi posicionada sobre a lâmina de vidro e então se procedeu a fotoativação pelo tempo descrito anteriormente (Figura 4). Decorridos os períodos de fotoativação do RU e VB, e de reação química de presa do HCa e RL, os corpos-de-prova com as dimensões definidas foram removidos do interior da matriz de polietileno, por pressão do êmbolo localizado logo abaixo dos espécimes (Figura 5). Com o auxílio de uma pinça clínica esterilizada, os corpos-de-prova recém preparados foram posicionados na base dos compartimentos dos pratos de acrílico esterilizados que continham 1,1mL do meio de cultura desprovido de SFB (MC-SFB). Finalmente, estes pratos de acrílico com os materiais experimentais (corpos-de-prova) imersos

em MC-SFB foram colocados em incubadora, na temperatura de 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, onde permaneceram pelos períodos experimentais de 24 horas ou 7 dias.

A relação entre os grupos experimentais e controle de acordo com períodos de avaliação e número de espécimes estão demonstrados na tabela 2.



Figura 3: Posicionamento da lâmina de vidro sobre a extremidade aberta da matriz. Note que a pressão exercida pela lâmina de vidro causou extravasamento do material, o qual foi mecanicamente removido após a fotoativação.

Figura 4: Ponta ativa do fotopolimerizador aplicada exatamente sobre a extremidade aberta da matriz, os quais estavam interpostos pela lâmina de vidro com espessura de 1 mm. A utilização da lâmina teve a finalidade de regularizar a superfície do corpo-de-prova localizada na parte aberta da matriz bem como impedir a inibição da polimerização na presença de oxigênio, bem como padronizar a distância entre o material e a ponta ativa do fotopolimerizador.



Figura 5: Remoção do corpo-de-prova (CP) do interior da matriz de polietileno por pressão do embôlo (E).

Tabela 2: Relação entre grupos experimentais e controle de acordo com os períodos de avaliação e o número de espécimes. FOAr, 2005

Grupos Períodos	HCa	VB	RL	RU	DMEM	Total
24 horas	10	10	10	10	10	50
7 dias	10	10	10	10	10	50
Total	20	20	20	20	20	100

HCa – Hidróxido de Cálcio
 VB – Vitrebond™
 RL – RelyX™ Luting

RU – RelyX™ Unicem
 DMEM – Meio de cultura (controle)

3. Cultivo das células e avaliação do metabolismo celular

Um mililitro de meio de cultura completo (DMEM), contendo células da linhagem odontoblástica MDPC-23 (30.000 células/cm²), foi aplicado em cada um dos 24 compartimentos de 10 pratos de acrílico esterilizados, os quais foram colocados em incubadora umidificada na temperatura de 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar, pelo período de 72 horas. Logo após o tempo de incubação, o meio de cultura em contato com as células foi cuidadosamente aspirado, e substituído por 1 mL da solução que havia permanecido em contato com os corpos-de-prova pelo período de 24 horas ou 7 dias. Estas soluções experimentais, compostas por MC-SFB e possivelmente componentes dos materiais em estudo solúveis em meio aquoso, permaneceram em contato com as células pelo tempo de 24 horas em incubadora. Decorrido este período, os meios de cultura foram aspirados e armazenados em frascos Falcon de 15 mL (Corning Incorp., NY, USA) sendo identificados de acordo com cada um dos grupos experimentais, para determinação dos valores de pH das soluções (pHmetro GEHAKA PG 2000, Diadema, SP, Br).

Para o grupo controle, o meio de cultura sem soro fetal bovino permaneceu em incubação pelos períodos de 24 horas ou 7 dias, sendo que após estes tempos, as soluções foram aplicadas sobre as células cultivadas, como descrito anteriormente para os grupos experimentais (Tabela 2). Os valores do pH das soluções controle também foram determinados.

Os dez espécimes de cada grupo experimental e controle foram utilizados para a avaliação do metabolismo celular. Esta avaliação foi realizada através da aplicação da técnica do sal de metiltetrazolium (MTT assay), o que determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias. Para a preparação da

solução de MTT, 25 mg do sal de metiltetrazolium foi pesado em balança analítica de precisão (AG 200 GEHAKA, Diadema, São Paulo, Br) e, posteriormente, adicionados a 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS), alcançando uma mistura final de concentração igual a 5mg/mL (Figuras 6 e 7). Estas medidas empregadas equivalem a 10 compartimentos individuais de cada grupo experimental e controle onde em cada um foi dispensado 900 µL de meio de cultura mais 100 µL da solução do sal de metiltetrazolium. Esta solução foi incubada com as células em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, os pratos de acrílico foram retirados da incubadora (Figura 8), sendo que a mistura do meio de cultura com a solução do sal de metiltetrazolium mais PBS foi aspirada cuidadosamente. Após completa aspiração da solução, os cristais formados pela degradação dos anéis do sal de metiltetrazolium puderam ser observados aderidos ao fundo de cada compartimento individualizado. Para a solubilização destes cristais, 600 µL de isopropanol acidificado por cloreto de hidrogênio (HCl), na concentração de 0,04N, foram dispensados sobre as células localizadas ao fundo de cada compartimento dos grupos experimentais e controle (Figura 9). Estes cristais, quando dissolvidos pela presença do isopropanol, resultam em uma solução de coloração roxa de variada intensidade (Figura 7), a qual é quantificada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (Multiskan Ascent – 354, Labsystems CE, Les Ulis, France), em um comprimento de onda de 570nm.

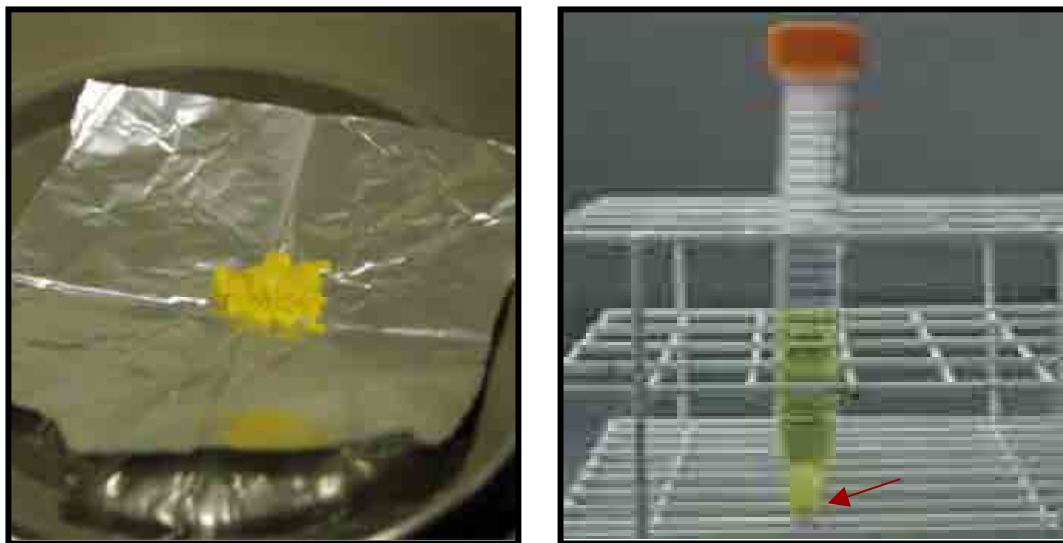


Figura 5: Sal de metiltetrazolium sendo pesado em balança de precisão.

Figura 7: Após adição do sal à quantidade de 5,5mL de tampão fosfato foi obtida a solução de MTT, a qual foi armazenada em tubo Falcon de 15 mL. Observa-se o sal depositado ao fundo do tubo Falcon anteriormente à sua dissolução (*seta*).

Para a leitura de todas as soluções, quatro alíquotas de 100 μ L de cada um dos compartimentos foram transferidas para outro prato de acrílico com 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) (Figura 10).

Os valores numéricos obtidos foram somados e a média calculada para, assim, serem transformadas em percentagem. Os valores percentuais obtidos foram utilizados para determinar o efeito inibitório da atividade mitocondrial das células.

Os dados de metabolismo celular expressos em valores numéricos foram também submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Mann-Whitney.



Figura 8: Grupos experimentais e controle após a retirada da incubadora. Os cristais de cor roxa (*estrela*) são produtos da degradação dos anéis do sal de metiltetrazolium, resultado da atividade da enzima mitocondrial desidrogenase succínica.

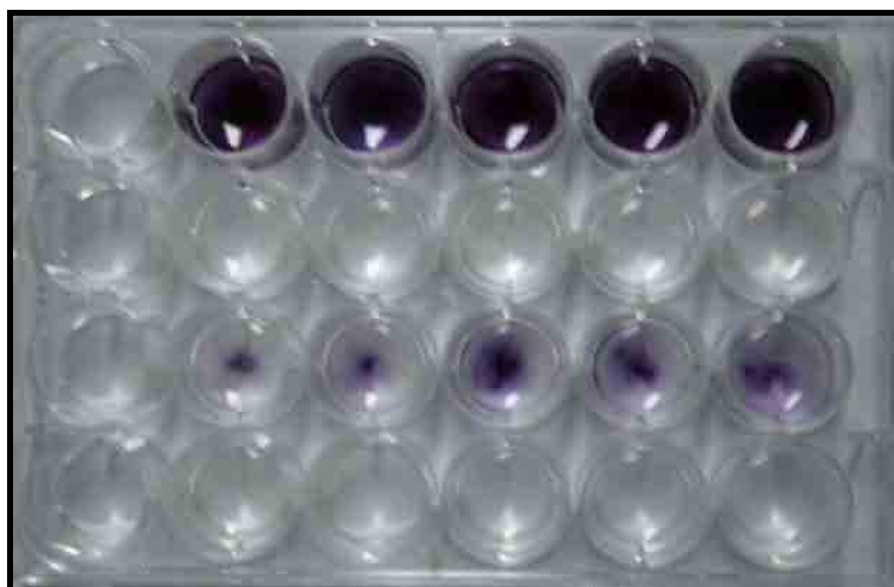


Figura 9: Solubilização dos cristais por acréscimo de 600 μL de isopropanol acidificado por cloreto de hidrogênio (HCl), na concentração de 0,04N, dispensados sobre as células localizadas ao fundo de cada compartimento dos grupos experimentais e controle.



Figura 10: Obtenção de soluções com coloração de variadas intensidades representando os grupos experimentais e controle.

4. Avaliação do pH

Como descrito anteriormente, logo após os períodos de incubação de 24 horas e 7 dias da solução de MC-SFB em contato com os corpos-de-prova, esta solução foi coletada e armazenada em frascos Falcon de 15 mL, identificados segundo cada grupo experimental e controle. Para obtenção dos valores de pH, o pHmetro Digital PG 2000 (GEHAKA, Diadema, São Paulo, Br) teve o seu eletrodo calibrado, empregando para isto, soluções com pH conhecidos: 4, 7 e 10 (LabSynth Produtos, Diadema, São Paulo, Br). Logo após a calibração, o eletrodo foi inserido no interior dos frascos Falcon referentes a cada grupo experimental e controle. Todos os valores de pH foram registrados bem como a temperatura de cada solução experimental e controle foi determinada.



RESULTADO

5 Resultados

Dados descritivos para a variável metabolismo celular (MTT) estão apresentados na Tabela 3. Devido a não distribuição normal dos valores de metabolismo celular (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$) testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram aplicados.

Tabela 3. Dados descritivos para a variável metabolismo celular (MTT) de acordo com o material e o período de avaliação. FOAr, 2005

Grupos	Períodos	N	Mediana	Média	Desvio padrão
			(absorvância de 570nm)		
HCa	24 horas	35	0,1096	0,1112	0,0538
RL		40	0,2415	0,2860	0,1481
VB		40	0,1029	0,1424	0,0893
RU		40	1,1678	1,2756	0,2761
DMEM		40	1,2157	1,3101	0,2747
HCá	7 dias	32	0,0652	0,1027	0,0567
RL		40	0,2487	0,2426	0,0913
VB		40	0,0804	0,1101	0,0551
RU		40	0,9869	1,0355	0,1221
DMEM		40	1,1816	1,1570	0,1568

O resultado do teste de Kruskal-Wallis aplicado para a comparação dos grupos nos períodos de 24 horas e 7 dias demonstrou haver diferenças entre eles ($p < 0,001$). Estas diferenças foram identificadas comparando-se os grupos dois a

dois através da aplicação de testes de Mann-Whitney, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Testes de Mann-Whitney para comparação aos pares dos materiais de acordo com o período de contato com as células. FOAr, 2005.

Comparação	Período	
	24 horas	7 dias
HCa vs. RL	0,0001*	0,0001
HCa vs. VB	0,206	0,084
HCa vs. RU	0,0001	0,0001
HCa vs. DMEM	0,0001	0,0001
RL vs. VB	0,0001	0,0001
RL vs. RU	0,0001	0,0001
RL vs. DMEM	0,0001	0,0001
VB vs. RU	0,0001	0,0001
VB vs. DMEM	0,0001	0,0001
RU vs. DMEM	0,179	0,0001

* valores de p menores do que 0,05 representam diferença estatisticamente significativa entre as médias comparadas.

Pelos resultados demonstrados na Tabela 4, os materiais que apresentaram maior efeito citotóxico sobre as células MDPC-23 no período de 24 horas foram os cimentos de hidróxido de cálcio (HCa) e de ionômero de vidro Vitrebond (VB), sem diferença estatística entre eles ($p=0,206$). Esses materiais foram seguidos em toxicidade pelo cimento resinoso RelyX Luting (RL). O material menos tóxico nesse mesmo período de avaliação foi o cimento resinoso autocondicionante RelyX Unicem (RU), uma vez que os valores de metabolismo celular observados para esse grupo não diferiram estatisticamente dos observados para o grupo controle (DMEM, $p=0,179$). Desta forma, em ordem decrescente de toxicidade,

podemos representar, de maneira comparativa, para o período de 24 horas, o seguinte ranking de classificação dos materiais quanto à seus efeitos tóxicos: HCa = VB > RL > RU = DMEM.

No período de 7 dias, a mesma seqüência para citotoxicidade pode ser considerada, com exceção do cimento resinoso RelyX Unicem (RU), o qual promoveu maior redução do metabolismo celular quando comparado ao grupo controle DMEM (Tabela 4, $p < 0.001$). Em ordem decrescente de toxicidade podemos representar o seguinte ranking para os materiais testados com relação ao grupo controle: HCa = VB > RL > RU > DMEM. As comparações estatísticas entre os grupos podem ser visualmente analisadas na figura 11, onde colunas com letras iguais representam médias que não diferem estatisticamente segundo os dados obtidos através da aplicação dos testes de Mann-Whitney.

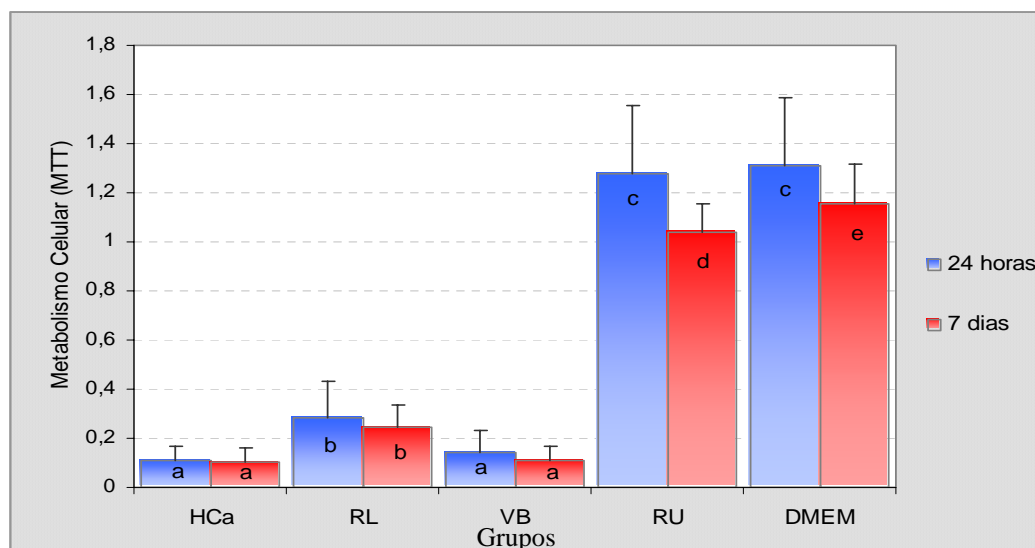


Figura 11: Representação gráfica do comportamento da variável metabolismo celular (MTT) de acordo com os materiais e períodos de avaliação. Colunas com letras iguais representam médias não diferentes estatisticamente (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Os materiais foram avaliados individualmente quanto a sua citotoxicidade em função dos períodos de contato com as células pela aplicação de testes de Mann-Whitney, cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 5.

Os materiais cimento de hidróxido de cálcio (HCa), cimento ionomérico RelyX (RL) e Vitrebond (VB) mantiveram sua alta citotoxicidade após 7 dias de contato com as células, enquanto que para os demais materiais dentários avaliados, houve um aumento dessa ação tóxica caracterizado pela redução do metabolismo celular (Tabela 5, Figura 11).

Tabela 5. Comportamento citotóxico dos materiais comparando-se os períodos de avaliação. FOAr, 2005.

Material	24 horas vs. 7 dias
Hidróxido de cálcio (HCa)	0,518*
RelyX (RL)	0,600
Vitrebond (VB)	0,697
RelyX Unicem (RU)	0,0001
Meio cultura (DMEM)	0,015

* valores de p maiores do que 0,05 indicam ausência de diferença estatística entre as médias comparadas.

Os valores percentuais de redução no metabolismo celular para cada período experimental estão representados graficamente na figura 12. Dessa forma, para o período experimental de 24 horas os materiais HCa, RL, VB e RU determinaram valores de redução no metabolismo celular de: 91,52%, 78,17%, 81,14% e 2,64%, respectivamente. Para o período experimental de 7 dias, a taxa de redução para a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase succínica para

os mesmos materiais seguindo a mesma ordem foi de: 91,13%, 79,04%, 87,27%, 10,51%, respectivamente.

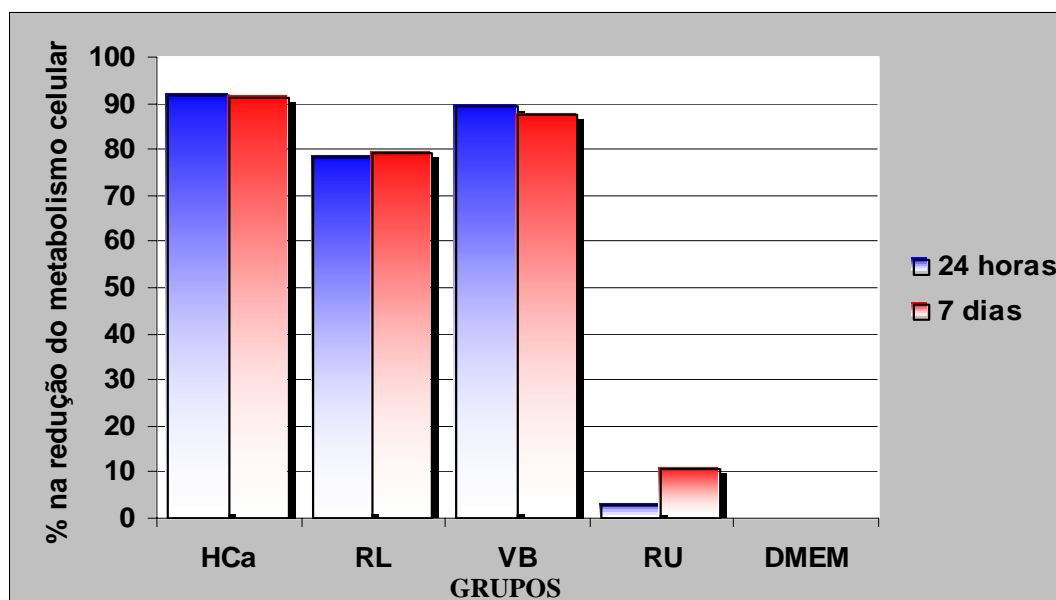


Figura 12: Representação gráfica da taxa percentual na redução do metabolismo celular (MTT) de acordo com os materiais e períodos de avaliação.

Além do cálculo dos valores percentuais, os quais representam os níveis de metabolismo celular, procuramos averiguar antes e após a inserção dos materiais em meio de cultura os valores do pH desta solução. Estes valores estão demonstrados na tabela 6 para os períodos de 24 horas e 7 dias, bem como anteriormente à incubação dos materiais.

Tabela 6. Valores do pH das soluções de meio de cultura antes, 24 horas e 7 dias de incubação do meio de cultura com os materiais experimentais. FOAr, 2005

pH das soluções			
Materiais	Antes da incubação	24 horas	7 dias
HCa	7,4	8,7	8,3
RL	7,4	7,9	7,7
VB	7,4	8,1	8,4
RU	7,4	8,0	8,1
DMEM	7,4	8,1	8,3



DISCUSSÃO

6 Discussão

A avaliação *in vivo* da biocompatibilidade de materiais dentários empregados em diferentes procedimentos clínicos na área da odontologia, permite uma íntima aproximação da metodologia científica com a realidade clínica. Todavia, pesquisas que empregam seres humanos como amostra experimental enfrentam considerações éticas e legais, as quais são obstáculos para a realização de trabalhos científicos (MURRAY et al., 2000). Devido às dificuldades de realização de testes pré-clínicos e de acordo com o notável avanço nas áreas da biologia molecular e bioquímica, é que os testes *in vitro*, os quais podem utilizar células cultivadas em laboratório, têm ganhado notável espaço no meio científico (HANKS et al., 1991; SCHMALZ et al., 1996; STANISLAWSKI et al., 1999). Além de apresentar fácil reprodução nos mais diferentes laboratórios em diversas partes do mundo, os testes *in vitro*, através de cultura de células, apresentam, também, custos relativamente baixos e maior rapidez de execução, quando comparados aos testes *in vivo* (HANKS et al., 1991; SCHMALZ et al., 1996).

Muitos estudos têm empregado diversas linhagens celulares para avaliação dos efeitos tóxicos de diferentes materiais empregados em odontologia (LEYHAUSEN et al., 1998; DEMARCO et al., 2001; COSTA et al., 2003a; RIBEIRO et al., 2004). Os variados tipos de células utilizados nos testes de citotoxicidade compreendem desde células cultivadas primariamente (células adquiridas a partir do corte e cultivo de determinado órgão ou tecido em meio de cultura) (HETEM et al., 1989; TORNECK et al. 1983), até células imortalizadas de linhagem contínua (MACDOUGAL, et al., 1998; COSTA et al., 1999). Todavia, recentes investigações têm demonstrado que tanto células adquiridas diretamente da

polpa dental ou tecido periodontal como àquelas mantidas em laboratório através de uma linhagem contínua são capazes de responder de forma diferente aos efeitos tóxicos pertinentes a um mesmo material (LEYHAUSEN et al., 1998; GEURTSEN et al., 1998a; HEIL et al., 2002). Segundo MacDougal et al., 1998, existe uma grande variabilidade entre as respostas citotóxicas de diferentes linhagens celulares aos materiais testados, sendo que até o momento, não há uma definição clara sobre qual tipo celular seria o mais indicado para os protocolos empregados na avaliação da toxicidade de materiais experimentais. Todavia, apesar de muitas pesquisas demonstrarem que há diferenças nas respostas entre os diversos tipos de células cultivadas para os ensaios de toxicidade, alguns pesquisadores acreditam que células odontoblásticas seriam uma boa opção em termos de avaliação dos efeitos adversos provenientes dos materiais capeadores e restauradores (MACDOUGAL et al., 1998; COSTA et al., 1999). A escolha por tais células se deve ao fato de que os odontoblastos formam uma camada de células na periferia da polpa dental e, em função de sua localização, são as primeiras células a receberem qualquer estímulo via túbulos dentinários. Dessa forma, muitos pesquisadores têm procurado avaliar o efeito tóxico de diversos materiais empregados como agente capeador de polpas expostas mecanicamente ou que permaneçam em íntimo contato com a estrutura dentinária quando inseridos em cavidades profundas (COSTA et al., 1999; HEBLING et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2000; MURRAY et al., 2002; COSTA et al., 2003C; COSTA et al., 2003d).

Dentre os diversos materiais odontológicos que tiveram suas propriedades biológicas avaliadas, o hidróxido de cálcio, tanto na forma de pó como na forma de cimento pasta/pasta, têm sido o agente capeador de primeira escolha em situações de

exposição do tecido pulpar. Segundo Torneck et al., 1983, esta indicação decorre do fato que tal material possui propriedade antibacteriana definida e alto potencial para participar, mesmo que indiretamente, da formação da barreira dentinária, evento este que parece ser um sinal concreto que evidencia e caracteriza o processo de cura do tecido pulpar. Quando aplicado sobre polpas expostas, o hidróxido de cálcio desenvolve uma necrose superficial composta por três camadas, que são estabelecidas dentro de uma hora, demarcando limites com o tecido sadio, porém em processo de inflamação (SCHRÖDER, 1985). Das três camadas formadas, a mais próxima do tecido pulpar vital caracteriza-se como necrose de coagulação, resultante da neutralização dos íons hidroxila (OH^-) provenientes da dissolução do material à base de hidróxido de cálcio (SCHRÖDER, 1985). Acredita-se que a concentração dos íons OH^- seja responsável por essas alterações iniciais no tecido pulpar. Todavia, anteriormente à aplicação deste agente capeador em polpas mecanicamente expostas de animais ou em seres humanos, alguns estudos avaliaram o potencial citotóxico deste material quando aplicado diretamente sobre distintas culturas de células (FITZGERALD et al., 1979; GORDON et al., 1985; HETEM et al., 1989). Segundo Seux et al., 1991, íons cálcio (Ca^{+2}) têm sido observados em soluções de cultivo celular, demonstrando que os íons liberados dos cimentos à base de hidróxido de cálcio, quando em contato com meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, induzem a precipitação de cristais de calcita (CaCO_3). A presença desses cristais, por sua vez, não interferem no crescimento das células por um período de quatro semanas. Pelo contrário, intensa coloração em

imunofluorescência é notada para a síntese de colágeno tipo I e fibronectina nas áreas próximas aos cristais de calcita. Na presente pesquisa, testes para verificação da presença de colágeno ou de outras proteínas que poderiam ser sintetizadas na presença do cimento de hidróxido de cálcio, bem como avaliação da presença ou ausência de cristais de calcita não foram realizados. Por outro lado, quando a análise da atividade mitocondrial das células MDPC-23 foi realizada para dois períodos de incubação dos materiais experimentais, os resultados determinaram que o hidróxido de cálcio, na forma de cimento, foi o material experimental capaz de reduzir, em maior intensidade, a atividade metabólica das células odontoblásticas MDPC-23 ao nível de 91,52% e 91,13% para os períodos de 24 horas e 7 dias, respectivamente. Este fato caracteriza o intenso efeito citotóxico do cimento de hidróxido de cálcio avaliado na presente pesquisa.

Recentes investigações têm revelado que os cimentos de hidróxido de cálcio, tais como Hypocal, Dycal, Life e Calasept, são materiais tóxicos quando em contato com meio de cultura ou aplicados em cultura de tecidos (HETEM et al., 1989; SCHEDULE et al., 1998; MURRAY et al., 2000). Estes mesmos autores puderam verificar que a aplicação de hidróxido de cálcio sobre células da polpa leva a uma redução em volume do tecido pulpar, em virtude da notável perda tecidual causada pela morte celular e posterior necrose local. Esta redução no volume pulpar foi confirmada, quando algumas características histológicas, tais como cariólise (ruptura e degradação do núcleo celular) e picnose (contração e intensa basofilia do material nuclear) puderam ser visualizados nas células odontoblásticas e fibroblastos pulpares, através de análise tecidual em

microscopia de luz. Este efeito altamente citotóxico dos cimentos parece não ocorrer quando soluções à base de hidróxido de cálcio são aplicadas sobre cultura de células. Estudos nos quais soluções de água destilada e pó de hidróxido de cálcio empregada para lavagem de cavidades foram avaliadas quanto ao potencial de redução no metabolismo celular, os resultados puderam determinar que pouca toxicidade foi gerada por esta solução experimental (COSTA et al., 2001). Estudo preliminar também demonstrou que uma solução de hidróxido de cálcio em água destilada (0,0121g/10mL) aplicada em diferentes volumes (0,025 mL e 0,05 mL) é capaz de aumentar a absorção de [³H] TdR (marcador para a síntese de DNA), indicando elevação na síntese desta molécula (TORNECK et al., 1983). A partir disto, hipotetizou-se que a concentração de íons Ca⁺² livres tem a capacidade de estimular ou inibir a atividade celular. Dessa forma, pode-se sugerir que as concentrações de íons Ca⁺² livres nas soluções de hidróxido de cálcio seja inferior àquela observada para os cimentos de hidróxido de cálcio colocados em meio aquoso após sua manipulação. A dissolução do material parece estar diretamente relacionada com a liberação dos íons e seu conseqüente efeito tóxico. Todavia, na presente pesquisa, os efeitos tóxicos do HCa não foram estritamente diferentes quando os períodos de 24 horas e 7 dias foram comparados. Isto sugere que a dissolução do cimento ocorre quase que exclusivamente nas primeiras 24 horas de exposição ao meio de cultura.

Segundo Murray et al., 2000, a toxicidade gerada pelos cimentos a base de hidróxido de cálcio foi resultado da presença de um de seus componentes inseridos no cimento para efetuar a presa do material após sua mistura. Tal

composto, o ácido salicílico, em sua forma pura, apresentou alta toxicidade sobre células pulpares quando aplicado em contato direto com a polpa dental. Isto poderia explicar o motivo de alguns produtos à base de hidróxido de cálcio apresentarem graus diferenciados de toxicidade sobre células da polpa, os quais são inferiores àqueles observados para as soluções de hidróxido de cálcio que não contêm ácido salicílico em sua composição.

Assim como ocorre com os diferentes cimentos à base de hidróxido de cálcio, diversos cimentos de ionômero de vidro também têm o potencial de gerar injúrias de variada intensidade quando aplicados sobre células da polpa dental. Atualmente, a odontologia restauradora empregada como material para forramento cavitário dois tipos de cimentos ionôméricos: o cimento de ionômero de vidro convencional (CIVc) e cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIV-MR). Os CIVc apesar de apresentarem interessantes propriedades mecânicas e químicas, algumas falhas, tais como: 1) menor tempo de trabalho, e 2) notável perda ou ganho de água após manipulação, dificultaram a ampla aceitação deste tipo de material para aplicação em diferentes procedimentos clínicos. Desta maneira, monômeros resinosos foram adicionados à composição dos cimentos ionoméricos convencionais, dando origem aos chamados cimentos de ionômero de vidro modificados por resina. A incorporação de monômeros resinosos, dentre os quais o HEMA é encontrado na grande maioria dos CIV-MR, melhorou as características de presa deste material, aumentando o seu tempo de trabalho bem como sua resistência à contaminação pela água (COSTA et al., 2003a). Todavia, muitos estudos têm demonstrado que extratos de diferentes

materiais quando aplicados sobre células cultivadas são capazes de induzir efeitos genotóxicos bem como diminuir a taxa de proliferação celular e, assim o número de células (SCHEDLE et al., 1998; MÜLLER et al., 2003). A explicação para tal evidência consiste no fato de que certos componentes que não reagiram durante o processo de endurecimento, tais como os monômeros resinosos que não se converteram em polímeros durante a fotopolimerização do material, são capazes de se difundir para o meio aquoso no qual os espécimes experimentais permaneceram incubados por diferentes períodos (LEYHAUSEN et al., 1998; HAMID et al., 1998; PALMER et al., 1999). Assim, apesar dos avanços obtidos com relação às propriedades físicas e mecânicas dos CIV-MR quando da incorporação de monômeros resinosos na composição deste material, estudos têm demonstrado que as novidades na formulação deste agente protetor do complexo dentino-pulpar têm desencadeado efeitos adversos sobre células da polpa dental (SCHMALZ et al., 1996; LEWIS et al., 1996; MULLER et al., 2003; SHOEILI MAJD et al., 2003). Diversas pesquisas (OLIVA et al., 1996; STANILAWSKI et al., 1999; SHOEILI et al., 2003) têm demonstrado que muitos componentes de natureza inorgânica, tais como F^- , Al^{3+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , cálcio e fosfato têm sido encontrados em extratos de meio aquoso nos quais diferentes cimentos ionoméricos foram mantidos em contato (STANISLAWSKI et al., 1999). Alguns desses elementos, particularmente o Zn^{2+} , têm se mostrado tóxicos, mesmo quando em concentrações muito baixas. Por outro lado, íons como o Al^{3+} e F^- se mostraram tóxicos apenas quando em altas concentrações. Segundo Chang & Chou, 2001, os íons flúor somente alteram o metabolismo celular ou interferem na síntese de macromoléculas, quando altas concentrações destes íons são liberadas. Além

destes componentes inorgânicos, outras pesquisas também comprovaram que monômeros resinosos presentes nas formulações dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina são capazes, em maior escala, de desencadear efeitos adversos sobre diversos tipos celulares (LEYHAUSEN et al., 1998; COSTA et al., 2003a). Oliva et al., 1996, destinaram os efeitos tóxicos causados pelo cimento de ionômero de vidro modificado resina Vitremer a pelo menos dois componentes liberados da fase líquida: o monômero hidrofílico HEMA e espécies ácidas não identificadas. Recentes investigações também têm atribuído ao HEMA efeitos tóxicos que culminaram com a diminuição da taxa de proliferação e síntese de macromoléculas ou induziram à morte celular (GEURTSSEN et al., 1998a; GEURSTEN et al., 1998b; LEYHAUSEN et al., 1998; COSTA et al., 2003a). No presente estudo, VB e RL foram capazes de reduzir o metabolismo celular a níveis percentuais de 89,14%; 78,17% e 87,27%; 79,04% para os períodos de 24 horas e 7 dias, respectivamente. De acordo com o teste estatístico de Mann-Whitney aplicado para a comparação dos grupos dois a dois, diferenças estatísticas puderam ser observadas entre os dois cimentos de ionômero de vidro experimentais, apontando um grau de citotoxicidade maior para o Vitrebond. Todavia, segundo o fabricante, ambos cimentos possuem HEMA incorporados à fase líquida, porém em quantidade diferentes, ou seja, de 20-30% para o VB e 25-35% para o RL. Assim, com base nos dados sobre a quantidade de HEMA encontrada nos dois materiais, seria esperado que os maiores efeitos tóxicos sobre as células odontoblásticas fossem originados do cimento de ionômero de vidro RL em detrimento ao Vitrebond. Todavia, na presente pesquisa, o Vitrebond

apresentou efeitos citopáticos superiores ao RL. Talvez este dado possa ser explicado pelo fato que não apenas o monômero hidrofílico HEMA seja capaz de induzir células à alterações no seu metabolismo, mas também outros compostos presentes no Vitrebond exercem efeitos tóxicos internos sobre células cultivadas, tais como os compostos cloreto de benzeno, iodeto de benzeno e brometo de benzeno, os quais são produtos da decomposição do cloreto de difeniliodônio (DPICI), fotoiniciador alternativo a canforoquinona (GEURTSSEN et al., 1998b). Outro fator que poderia ter sido coadjuvante para causar efeito citotóxico superior para o VB quando comparado ao RL é o pH determinado para cada material. VB apresentou pH que alcançou o valor máximo de 8,4, ao passo que RL apresentou pH com valor máximo de 7,9. Assim como demonstrado na literatura (COSTA et al., 1999), o valor do pH do meio de cultura em contato com materiais dentários experimentais participam diretamente do efeito citotóxico deles.

A biocompatibilidade do CIV-MR Vitrebond também têm sido analisada tanto em animais (NASCIMENTO et al., 2000; COSTA et al., 2003c) quanto em seres humanos (COSTA et al., 2003d). O Vitrebond quando utilizado para o forramento de cavidades profundas preparadas em dentes humanos (COSTA et al., 2003d), foi bem tolerado pelos tecidos pulpares, com ausência de resposta inflamatória e desorganização tecidual. Estes resultados têm sido explicados por outros autores (BOUILLAGUET et al., 1996; STANISLAWSKI et al., 1999) ao sugerirem que a estrutura dentinária é capaz de proteger as células pulpares contra os possíveis danos causados por estes materiais odontológicos. Quando Vitrebond foi aplicado diretamente sobre polpas expostas em dentes de ratos, ocorreu

formação de fibrodentina rica em células, seguida de deposição de barreira mineralizada (COSTA et al., 2003c). Estes resultados não foram consistentes com aqueles obtidos por Nascimento et al. (2000), onde dentes humanos foram capeados com Vitrebond. Os autores puderam observar resposta inflamatória persistente com intensidade moderada, zona de necrose extensa, bem como ausência de formação de ponte dentinária. Em ambos trabalhos de pesquisa, os autores demonstraram que os componentes do Vitrebond se solubilizaram em contato com tecido pulpar e, conseqüentemente, difundiram se para o interior deste tecido. No entanto é importante relatar que a diferença de resultados histológicos do tecido pulpar observados em polpas de ratos com àqueles observados para polpas de dentes humanos possivelmente pode ser atribuída a diferente capacidade de reparação tecidual apresentada por cada espécie. Além disso, estudos têm sugerido que os resultados observados em experimentos realizados em dentes humanos não devem ser extrapolados para situações clínicas, especialmente àqueles resultados obtidos de experimentos onde se utilizam dentes de animais (COSTA et al., 2003c). Apesar de tais diferenças, os dados científicos caracterizam a falta de biocompatibilidade do CIV-MR, especialmente pelo fato de seus componentes solúveis se difundirem para o interior da polpa dental, desencadeando resposta inflamatória crônica. Todavia, quando aplicado em cavidades dentárias como agente forrador, os CIV parecem apresentar excelentes propriedades biológicas por não causar danos ao tecido pulpar subjacente (COSTA et al., 2003d). Os autores sugeriram que a reação ácido-base característica do Vitrebond aplicado sobre o substrato dentinário origina cristais

que permanecem na embocadura dos túbulos de dentina reduzindo a possibilidade de sensibilidade pós-operatória e prevenindo a difusão de seus componentes para alcançar o espaço pulpar. Todavia, assim como demonstrado na presente pesquisa, o cimento de ionômero de Vitrebond pode ser considerado um material extremamente tóxico quando em contato com células.

De acordo com a literatura, outros monômeros resinosos, também encontrados em alguns cimentos de ionômero de vidro como o Ionoseal, são capazes de causar severas alterações celulares quando adicionados em meio de cultura (HANKS et al., 1991; THEILIG et al., 2000; ENGELMANN et al., 2001; SCHWEIKL et al., 2001; JANKE et al., 2003). Geralmente, monômeros como Bisfenol glicidil metacrilato (BisGMA), trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA) e uretano dimetacrilato (UDMA) são encontrados em maior quantidade em resinas compostas, sistemas adesivos e cimentos resinosos. Estes monômeros tornaram-se palco de inúmeras pesquisas, desde o momento em que os resultados de investigações preliminares apontaram para o intenso efeito citotóxico desses agentes quando em contato com células da polpa dental e ligamento periodontal (JONTELL et al., 1995; BOUILLAGUET et al., 1996; GEURTSSEN et al., 1998a; HEIL et al., 2002). Todavia, diferentes componentes dos materiais resinosos não apresentam o mesmo potencial tóxico quando aplicados em meio de cultura contendo células de diferentes linhagens. Pesquisas têm demonstrado que a toxicidade de cada constituinte de um determinado sistema adesivo, resina composta ou cimento resinoso está diretamente relacionada com a estrutura apresentada por cada composto (YOSHI, 1997). A presença e o tamanho das

cadeias de radicais ligados aos principais monômeros são fatores que podem aumentar a toxicidade de cada componente. Na presente pesquisa, um dos materiais experimentais com grande quantidade e diversidade de monômeros encontrados na sua formulação é o cimento resinoso RU. Este cimento, segundo informações do fabricante, possui a vantagem de diminuir o tempo clínico durante a cimentação de coroas, inlays e onlays por dispensar a etapa de condicionamento da superfície dentinária com soluções ácidas. Para esta vantagem clínica, um novo sistema de iniciadores, partículas de carga e monômeros modificados por ésteres fosfóricos foram desenvolvidos. Dentre estes monômeros, o TEGDMA aparece na quantidade de 27-38%. Este monômero tem sido alvo de vários estudos de citotoxicidade, nos quais os resultados demonstraram que este componente é capaz de desencadear severos efeitos tóxicos sobre células pulpares (HANKS et al., 1991; THEILIG et al., 2000; JANKE et al., 2003; ISSA et al., 2004). Recentes investigações têm demonstrado que o trietilenoglicoldimetacrilato (TEGDMA) é capaz de induzir células ao processo de apoptose bem como reduzir a expressão de certas proteínas essenciais no processo de reparo do tecido pulpar (ABOUT et al., 2002; KLEINSASSER et al., 2004; SPAGNULO et al., 2004). Todavia, no presente estudo, o cimento resinoso no qual o TEGDMA apresenta-se em grande quantidade, determinou os menores níveis de redução da respiração mitocondrial com valores percentuais de 2,64% e 10,51% para os períodos de 24 horas e 7 dias, respectivamente. Segundo o método estatístico de Mann-Whitney, os valores de metabolismo celular observados para esse grupo não diferiram estatisticamente dos observados para o grupo controle (DMEM) no período de 24 horas. Por outro

lado, quando este cimento foi comparado com os outros materiais experimentais, diferenças significantes puderam ser observadas para ambos os períodos estudados. Assim, de maneira comparativa, o seguinte ranking de classificação dos materiais quanto à seus efeitos tóxicos foi: HCa=VB>RL>RU=DMEM.

Ainda, de acordo com o teste estatístico de Mann-Whitney, no período de 7 dias o cimento resinoso RU promoveu maior redução do metabolismo celular quando comparado com o grupo controle DMEM. Dessa forma, em ordem decrescente de toxicidade, os materiais testados apresentaram o seguinte ranking segundo o grupo controle: HCa=VB>RL>RU>DMEM. Novamente, era de se esperar que RU fosse, dentre todos os materiais estudados, o agente com maior capacidade de produzir efeito tóxico neste período de 7 dias, visto que esse material apresenta altas concentrações de monômeros resinosos (principalmente TEGDMA), considerados mais tóxico do que o HEMA presente nos demais materiais resinosos avaliados na presente pesquisa (MACDOUGALL et al., 1998; MANTELLINI, et al.; 2003). Por outro lado, o RU foi o material menos tóxico em ambos os períodos de avaliação, podendo-se sugerir que a reação química de seus diversos componentes poderia, de alguma maneira, reduzir a dissolução do material e/ou diminuir a quantidade de monômeros livres que não reagiram. Assim, uma análise dos componentes deste material resinoso parece ser importante. O pó do cimento resinoso RU é constituído de pó de vidro silanizado (85-95% em peso), sílica silanizada (5-10% em peso), hidróxido de cálcio (1-5% em peso), pirimidina substituída (1-5% em peso) e um iniciador de polimerização persulfato de sódio (<1% em peso). Este último componente é empregado em diversos copolímeros (estireno/acrilato de butila, acetato de vinila/acrilato de butila/ácido metacrílico e

acrilato de butila/metacrilato de metila/ácidometacrílico) produzidos em emulsão com a finalidade de iniciar reações de conversão de monômeros em polímeros (HIROTA et al., 2004). Além desta finalidade, este mesmo estudo demonstrou que o persulfato de sódio funciona como um sistema de oxi-redução, aumentando a porcentagem de radicais livres com capacidade de reagirem entre si, reduzindo, assim, o teor de monômeros residuais ao final da etapa de polimerização. Além disso, os autores sugeriram que a ação conjunta do persulfato de sódio com o aumento de temperatura durante a reação de endurecimento do material, parecem também reduzir, em conjunto, o teor de monômeros residuais. Todavia, foi observado que ao final de 7 dias o efeito tóxico do cimento resinoso RU diferiu estatisticamente do grupo controle, porém não estendendo para valores maiores do que aqueles comparados aos outros grupos experimentais (HCa, VB e RL). Como descrito anteriormente, foi observado que a quantidade de persulfato de sódio encontrado na formulação do cimento RU é pequena (1-5% em peso). Possivelmente, a pequena quantidade deste sistema iniciador foi responsável por diminuir o teor inicial de monômeros residuais liberados nos primeiros períodos de incubação, não sendo suficiente por eliminar todos os monômeros que não reagiram. Porém, sugere-se que com o decorrer do tempo, pequena dissolução do material incubado e liberação de alguns outros componentes além do TEGDMA, possa ter culminado com o discreto efeito citotóxico observado aos 7 dias para o RU. Além disso, estudos têm demonstrado que a molécula de TEGDMA é facilmente decomposta por enzimas, tendo como produtos desta decomposição moléculas de peso molecular baixo (TEGMA), o que facilita a sua mobilidade pelo interior da matriz (SHAJII, et al., 1999). A liberação deste composto pode perdurar por um período prolongado de até 32 dias.

Os variados tipos celulares, quando empregados em testes que se dispõem a avaliar o efeito tóxico de diferentes materiais, são susceptíveis a qualquer alteração no meio de cultura, do qual as células retiram nutrientes necessários para a sua permanência em compartimentos de acrílico. Assim, qualquer fator exógeno que venha, por qualquer motivo, alterar as condições do meio de cultura, podem comprometer os resultados dos testes de citotoxicidade. Dentre estes fatores, possíveis alterações nos valores de pH tem sido um ponto a ser analisado durante os experimentos de citotoxicidade (CONSIGLIO et al., 1998). Este fator já foi anteriormente discutido na literatura (STANILAWISKI et al., 1999; COSTA et al., 2001), sendo que na presente pesquisa, o valor do pH dos meios de cultura nos quais os materiais experimentais permaneceram incubados pelos períodos de 24 horas e 7 dias em avaliação sofreu discreta alteração. Dentre todos os materiais experimentais avaliados quanto às alterações no metabolismo celular, o hidróxido de cálcio foi o único que apresentou maior elevação do pH (8,7 para o período de 24 horas). Estudos têm demonstrado que o aumento do pH não tem resultado em maior eficácia de um determinado material no processo de reparação da polpa, uma vez que outras soluções com alta alcalinidade não apresentam os mesmos resultados (GORDON et al., 1985). A explicação para tal fato é que o pH de uma solução cujo componente é um sal originado de um hidróxido está diretamente relacionada com sua constante de ionização e de solubilidade, ou seja, na tendência em se dissociar em cátions e grupos hidroxilas. Por exemplo, o hidróxido de bário e hidróxido de cálcio são moderadamente solúveis quando comparados com outros hidróxidos, como o hidróxido de sódio (NaOH) e de potássio (KOH). Com respeito ao fator de solubilidade, NaOH e KOH se dissociam quase que completamente.

Conseqüentemente, soluções saturadas destes compostos exibem alto valor de pH (aproximadamente 14), em virtude da notável presença de íons hidroxila no meio aquoso. No entanto, soluções saturadas, as quais exibem valor de pH igual a 12, fator indicativo de grande presença de íons hidroxila, não apresentam aumento na atividade de fosfatase alcalina, proteína expressa em situações de mineralização. Pelo contrário, a atividade desta enzima foi suprimida na presença de soluções concentradas de hidróxido de cálcio. Todavia, acredita-se que os estímulos originados pela aplicação do hidróxido de cálcio *in vivo* decorrem da presença de um pH considerado ótimo, o qual permite perfeita ação da fosfatase alcalina, além de favorecer a cura pela sua propriedade antibacteriana (GORDON et al., 1985). Contrariando esses achados científicos, pesquisas recentes têm demonstrado que o aumento na concentração de íons cálcio no meio extracelular resulta em queda na expressão de fosfatase alcalina por células pulpares (RASHID et al., 2003), podendo ainda resultar em lesão celular ou inibição do metabolismo celular, como demonstrado na presente pesquisa.

Outros estudos têm relatado que os cimentos de ionômero de vidro também mantêm os valores de pH baixos por alguns minutos após a retirada da fonte de luz visível (BEM-AMAR et al., 1999). Segundo estes autores, a elevação nos valores de pH tanto dos cimentos convencionais quanto daqueles modificados por resina ocorre nos primeiros nove minutos iniciais após a mistura do pó ao líquido, podendo alcançar pH com valores iguais a 8. Embora na presente pesquisa os corpos-de-prova preparados com os cimentos de ionômero de vidro tenham permanecido incubados por 24 horas e 7 dias em meio de cultura não

suplementado, os valores de pH para RL e VB foram iguais a 7,9 e 8,1 (24 horas) e 7,7 e 8,4 (7 dias), respectivamente. De certa forma, os valores encontrados na presente pesquisa são similares ou próximos àqueles observados na literatura para esses materiais, sendo que esta variação de valores de pH poderia contribuir, de certa maneira, com o efeito citotóxico do material. Todavia, como o valor de pH do DMEM foi de 8,1 e 8,3 nos períodos de 24 horas e 7 dias, respectivamente, sugere-se que para os cimentos avaliados, mais importante do que o valor do pH, os próprios componentes liberados dos materiais em meio de cultura seriam os responsáveis pelo definido efeito tóxico determinado.

Embora os resultados do presente estudo tenham demonstrado uma alta citotoxicidade de materiais como cimento de hidróxido de cálcio e cimentos de ionômero de vidro VB e RL, os dados desta pesquisa não podem ser extrapolados para situações clínicas. Esta etapa de pesquisa resume-se a um primeiro nível de estudo dos efeitos biológicos dos materiais através dos quais novos produtos deveriam ser submetidos. Por isso, para uma avaliação mais detalhada do cimento resinoso RU, posto que este material apresentou os menores efeitos citotóxicos sobre as células MDPC-23, outras pesquisas tanto em animais de laboratório quanto em dentes de seres humanos devem ser realizadas. Isto permitirá que os profissionais da odontologia possam usufruir destas excelentes propriedades biológicas preliminares do RU nos diversos procedimentos clínicos para os quais este material é recomendado para aplicação.



CONCLUSÃO

7 Conclusão

Com base na metodologia empregada e na obtenção dos resultados submetidos aos métodos estatísticos adequados para comparação, pode-se concluir que:

- De todos os materiais testados, o cimento de hidróxido de cálcio e o cimento de ionômero de vidro VB foram os materiais responsáveis pelos maiores valores de redução do metabolismo celular das células MDPC-23;
- A incubação dos espécimes para o período de 24 horas e 7 dias pouca significância teve quanto a toxicidade causada pelos materiais HCa, RL e VB;
- Dentre os cimentos avaliados na presente pesquisa, o RU foi aquele que causou menor efeito citotóxico sobre as células MDPC-23.



REFERÊNCIA

Referências*

ABOUT, I.; CAMPS, J.; MITSIADIS, T.A et al. Influence of resinous monomers on the differentiation *in vitro* of human pulp cells into odontoblasts. **J. Biomed. Mater. Res. (Appl Biomater)**, New York, v.63, n.4, p.418-423 2002.

BOUILLAGUET. S; WATAHA. J,C; HANKS, C.T.; et al.. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. **J Endod.**, Chicago, v.22, n.5, p.244-248, May 1996.

BEM-AMAR, A; LIBERMAN, R.; APATOWSKY, U. et al. pH changes of glass-ionomer lining materials at various time intervals. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.26, n.11, p.847-852, Nov., 1999.

BOWEN, R.L.; EICK, J.D.; HENDERSON, D.A. et al. Smear Layer: removal and bonding considerations. **Oper. Dent.**, Seattle, v.3, p.30-34 1984.

CHANG, Y.C.; CHOU, M.Y. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures *in vitro*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v.91, n.2, p.230-234, Feb. 2001.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002.24p.

CONSIGLIO, R.; RENGO, S.; LIGUORO, D. et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein sintesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.43, n.1, p.65-71, Jan. 1998.

COSTA, C.A.; VAERTEN, M.A.; EDWARDS, C.T. et al. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.15, n.6, 434-441, Nov. 1999.

COSTA, C.A.S.; EDWARDS, C.A.; HANKS, C.T. Cytotoxicity effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v.14, n.1, p.25-30, Feb., 2001.

COSTA CAS; NASCIMENTO, A.B..L.; TEIXEIRA, H.M. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.18, n.7, p.543-551, Nov 2002.

COSTA, C.A.S.; HEBLING J.; GARCIA-GODOY, F. et al. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. **Biomater.**, Guildford, v.24, n.21, p.3853-3858, Sept. 2003a.

COSTA, C.A.S.; HEBLING, J.; HANKS, C.T. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. **Oper. Dent.**, Seattle, v.28, n.4, p.365-370, Jul/Ago. 2003b.

COSTA, C.A.S.; OLIVERIA, M.F.; GIRO, E.M.A. et al. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. **Int. Endod. J.**, Chicago, v.36, n.12, p.1-9, Dez. 2003c.

COSTA, C.A.S; NASCIMENTO, A.B.L.; TEIXEIRA, H.M. et al. Short-term of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.19, n.8, p.739-746, Dec. 2003d.

D'SOUZA, R. Development of the pulpodentin complex. In: Hargreaves, K.M. e Goodis, H.E. **Seltzer and Bender's Dental Pulp**. Ed. 3^a. China. Quintessence Publishing Co, Inc, 2002, cap. 2, p.13-40.

DEMARCO, F.F.; TARQUINO, S.B.C.; JAEGER, M.M.M. et al. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quint. Int.**, Berlim, v.32, n.3, p.211-220, Mar. 2001.

ENGELMANN, J.; JANKE, V.; VOLK, J. et al. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. **Biomater.**, Guilford, v.25, n.19, p.4573-4580, Aug. 2004.

ENGELMANN, J.; LEYHAUSEN, G.; LEIBRITZ D. et al. Metabolic effects of dental resin components in vitro detected by NMR spectroscopy. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.80, n.3, p.869-875, Mar. 2001.

FERRACANE, J.L.; CONDON, J.R. Rate elution of leachable components from composite. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.6, n.4, p.282-287, Oct. 1990.

FITZGERALD, M. Cellular Mechanics of dental bridge repair using ³H-Thymidine. **J. Dent. Res.** Alexandria, v.58, sp iss, p.2198-2206, Nov. 1979.

GERZINA, T.M.; HUME, W.R. Effects of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.74, n.1, p.369-373, Jan. 1995.

GERZINA, T.M.; HUME, W.R. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. **J. Dent.**, Bristol, v.24, n.1-2, p.125-128, Jan-May, 1996.

GEURTSSEN, W.; LEHMANN, F.; SPAHL, W. et al. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.41, n. 3, p.474-480, Sept. 1998a.

GEURTSSEN, W.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Residual monomer/additive and release variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.77, n.12, p.2012-2019, Dez. 1998b.

GORDON, T.M.; RANLY, D.M.; BOYAN, B.D. Effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations in pH and calcium concentration. **J. Endod.**, Chicago, v.11, n.4, p.156-160, Apr. 1985.

GWINNETT, J. e TAY, F.R. Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v.10, sp. Iss., p. S35-S44, Jan. 1998.

HAMID, A.; OKAMOTO, A.; IWAKU, M.; et al. Component release from light-activated ionomer and compomer cements. **J. Oral Rehab.**, Oxford., v.25, n.2, p.94-99, Feb. 1998.

HANKS, C.T.; STRAW, S.E.; WATAHA, J.C. et al. Cytotoxicity effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 70, n. 111, p.1450 – 1455, Nov. 1991.

HEBLING, J; GIRO, E.M.A.; COSTA, C.A.S. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. **J. Dent.**, Bristol, v.27, n.8, p.557-564, Nov. 1999.

HEIL, T.L.; VOLKMANN, K.R.; WATAHA, J.C. et al Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental material components. **J. Oral Rehab.**, Oxford, v.29, n.5, p.401-407, May, 2002.

HETEM, S.; JOWETT, A.K.; FERGUSON, M.W.J. Biocompatibility testing of a posterior composite and dental cements using a new organ culture model. **J. Dent.**, Chicago, v.17, n.4, p.155-161, Aug. 1989.

HIROTA, W.H.; REIS, M.M.; SAYER, C; et al. Efeitos da temperatura e do tipo de iniciador na redução do teor de monômero residual durante reações de copolimerização em emulsão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. V.14, n.1, p.51-56, Jan./Mar. 2004.

ISSA, Y.; WATTS, D.C.; BRUNTON, P.A. et al. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.20, n.1, p.12-20, Jan. 2004.

JANKE, V.; Von NEUHOFF, N.; SCHLEGELBERGER, B. et al. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.82, n.10, p.814-818, Oct. 2003.

JONTELL, M.; HANKS, C.T., BRATEL, J. et al. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.74, n.5, p. 1162-1167, May 1995.

KANCHANAVASITA, W.; PEARSON, G.J.; ANSTICE, H.M. Temperature rise in ion-leachable cements during setting reaction. **Biomater.**, Guildford, v.16, n.16, p.1261-1265, Nov. 1995.

KLEINSASSER, N.H.; WALLNER, B.C.; HARRÉUS, U.A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **J. Dent.**, Chicago, v.32, n. 3, p.229-234, Mar., 2004.

LEWIS, J.; NIX, L.; SCHUSTER, G. et al. Response of oral mucosa cells to glass-ionomer cements. **Biomater.**, Guildford, v.17, n.11, p.1115-1120, Jun., 1996.

LEYHAUSEN, G.; ABTAHI, M.; KARBAKHSCH, M.; et al. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. **Biomater.**, Guilford, v.19, n.6, p.559-564, Mar. 1998.

MACDOUGALL, M.; SELDEN, J.K.; NYDEGGER, J.R. et al. Immortalized mouse odontoblasto cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. **Am J Dent.**, San Antônio, v.11, Issue spc., p.11-16, Jan. 1998.

MANTELLINI, M.G.; BOTERO, T.M.; YAMAN, P. et al. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.82, n.8, p.592-596, Aug., 2003.

MJÖR, I. A.; SVEEN, O.B.; HEYERAAS, K.J. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. **Quint. Int.**, Berlin, v.32, n.6, p.427-446, Jun. 2001.

MÜLLER, B.P.; EISENTRÄGER, A.; JANHNEN-DECHENT, W. et al. Effect of sample preparation on the vitro genotoxicity of light curable glass ionômero cement. **Biomater.**, Guildford, v.24, n.4, p.611-617, Feb. 2003.

MURRAY, P.E.; LUMLEY, P.J.; ROSS, H.F. et al. Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials. **Biomater.**, Guildford, v.21, n.16, p.1711-1721, Aug. 2000.

MURRAY, P.E.; KITASAKO, Y.; TAGAMI, J. et al. Hierarchy of variables correlated to odontoblast-like cell numbers following pulp capping. **J. Dent.**, Chicago, v.30, n.7-8, p.297-304, Sept.-Oct., 2002.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.16, n.3, p.265-273, May, 1982.

NALÇACI, A.; ÖZTAN, M.; YILMAZ, S. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. **Int. Endod. J.**, Chicago, v.37, n.2, p.151-156, Feb., 2004.

NASCIMENTO, A.B.L.; FONTANA, U.F.; TEIXEIRA, HM. et al. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v.13, n.1, p.28-34, Feb 2000.

OLIVA, A.; RAGIONE, F. D.; SALERNO, A. et al. Biocompatibility studies on glass ionômero cements by primary cultures of human osteoblasts. **Biomater.**, Guildford, v.17, n.13, p.1351-1356, Jul. 1996.

PALMER, G.; ANSTICE, H.M.; PEARSON, G.J. Effect of curing regime on the release of hydroxyethyl metacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. **J. Dent.**, Bristol, v.27, n. 4, p.303-311, May 1999.

PASHLEY, D.H. Smear Layer: Physiological considerations. **Oper. Dent.**, Seattle, v.3, p.13-29 1984.

PASHLEY, D.H.; MICHELICH, V.; KEHL, T. Dentin permeability: effects of smear layer removal. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.46, n.5, p.531-537, Mar.,1981.

PAUL, S.J.; LEACH, M.; RUEGGEBERG, F.A. et al. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. **J. Dent.**, Bristol, v.27, n.3, p.209-214, Mar. 1999.

RASHID, F.; SHIBA, H.; MIZUNO, N. et al. The effect of extracellular calcium ion gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. **J. Endod.**, Chicago, v.20, n.2, p. 104-107, Feb. 2003.

RATANASATHIEN, S.; WATAHA, J.C.; HANKS, C.T. et al. Cytotoxicity interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.74, n.9, p.1602-1606, Sept.1995.

RIBEIRO, D.A.; MARQUES, M.E.A.; SALVADORI, D.M.F. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. **J. Endod.**, Chicago, v.30, n.8, p.593-596, Aug. 2004.

SCHEDLE, A.; FRANZ, A.; RAUSCH-FAN, X. et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive, substances, compomers and cements. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.14, n.6, p.429-440, Nov. 1998.

SCHMALZ, G.; SCHWEIKI, H.; ESCH, J. et al. Evaluation of dentin barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. **J. Endod.**, Chicago, v.22, n.3, p.112-115, Mar. 1996.

SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.64, sp iss., p.541-548, Apr. 1985.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. SPURSS, T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.80, n.7, p.1615-1620, July 2001.

SEUX, D.; COUBLE, L.M.; HARTMANN, D.J. et al. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro on the presence of a calcium hydroxide-containing cement. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.36, n.2, p.117-128, 1991.

SHAJII, L.; SANTERRE, P. Effect of content on profile of released biodegradation products in microfilled Bis-GMA/TEGDMA dental composite resins. **Biomater.** Guildford., v.20, n. 20, p.1897-1908, Oct. 1999.

SOHEILI MAJD, E.; GOLDBERG, M.; STANISLAWSKI, L. In vitro effects of ascorbate e Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. **Biomater.**, Guilford, v. 24, n.1, p. 3-9, Jan. 2003.

SPAGNUOLO, G.; GALLER, K.; SCMALZ, G. et al. Inhibiton of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDAM-induced apoptosis in primary human pulp cells. **J. Dent. Res.**, Chicago, v.93, n.3, p.703-707, Sept. 2004.

STANISLAWSKI, L.; DANIAU, X.; LAUTIÉ, A. et al. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionômero cements. **J. Biomed. Mater. Res. (Appl Biomater)**., New York, v.48, n.3, p.277-288, 1999.

TAKEDA, S; HASHIMOTO, Y.; MIURA, Y.; et la.. Cytotoxicity test of dental monomers using serum-free culture (*in vitro*) **J. Jp. Dent. Mater**, Tokyo. v.12, p. 613-619, 1993.

TAY, F.R.; PNAG, K.M.; GWINNET, A.J. e tal. A scanning electron microscopic study of the extent of resin penetration into human coronal dentin following a total etch technique *in vivo*. **Cells and Mater.**, Aberystwyth, v.4, n.4, p.317-329 1994.

TEN CATE, A.R. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, estrutura e função**. Ed. 5ª. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1998, cap. 8, p.123-142.

THEILIG, C.; TEGTMEIER, Y.; LEYHAUSEN, G.; et al. Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblast and keratinocytes. **J. Biomed. Res. (Appl Biomater)**., New York, v.53, n.6 , p.632-639 2000.

TORNECK, C.D.; MOE, H.; HOWLEY, T.P. The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. **J. Endod.**, Chicago, v.9, n.4, p.131-136, Apr. 1983.

WATANABE, I.; NIKAIDO, T.; NAKABAYSHI, N. Effect of adhesion promoting monomers on adhesion to ground dentin. **J. Jpn. Dent. Mater.**, Tokyo, v.9; n. 6, p.888-893, Nov. 1990.

YOSHI, E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structure and cytotoxicity. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 37, n.4, p. 517-524, Dez. 1997.



ANEXOS

Apêndice 1. Apresentação dos valores referentes ao metabolismo celular dos materiais estudados.

Valores referentes ao metabolismo celular									
24 horas					7 dias				
HCa	RL	VB	RU	DMEM	HCa	RL	VB	RU	DMEM
0,0609	0,3317	0,0497	1,1667	1,7251	0,1679	0,335	0,1973	1,1394	1,1716
0,1096	0,3373	0,0580	1,1334	1,6028	0,1949	0,3169	0,1898	1,2841	1,1982
0,1438	0,3662	0,0628	1,1910	1,5088	0,1929	0,2924	0,1636	1,3501	1,1494
0,1535	0,3558	0,0527	1,1903	1,3054	0,1784	0,2867	0,1613	1,3078	1,1553
0,1723	0,2686	0,0702	1,1408	1,9260	0,1712	0,2505	0,1128	1,2100	1,3149
0,1507	0,2877	0,0641	1,1171	1,3084	0,1588	0,2409	0,1404	1,2179	1,4224
0,1540	0,2789	0,0688	1,1102	1,2076	0,1458	0,2468	0,1456	1,2129	1,4313
0,1606	0,2693	0,0590	1,1145	1,9745	0,0574	0,2617	0,1672	1,1210	1,3857
0,1786	0,2287	0,0509	1,1364	1,6286	0,1242	0,3776	0,2099	1,0398	1,3856
0,1767	0,2283	0,0528	1,1424	1,2286	0,1773	0,3793	0,2351	0,9766	1,3464
0,1831	0,2316	0,0538	1,1783	1,0707	0,0576	0,3382	0,1055	0,9774	1,2829
0,0597	0,2128	0,0527	1,1485	2,2009	0,1938	0,1942	0,1993	0,9713	1,3159
0,1177	0,1275	0,0594	0,9245	1,6283	0,1795	0,1776	0,2014	0,9958	1,3186
0,1504	0,1279	0,0583	0,9433	1,2968	0,1587	0,2225	0,1741	1,1000	1,2329
0,1524	0,1276	0,0625	0,9588	1,0310	0,1392	0,2384	0,1621	1,1456	1,2521
0,1549	0,1375	0,0634	0,9409	1,2742	0,0553	0,2607	0,1556	1,0750	1,2399
0,2058	0,2262	0,0587	1,1716	1,6011	0,0626	0,2815	0,1054	1,0570	0,9998
0,1728	0,2294	0,0546	1,1641	1,2980	0,0592	0,2314	0,1060	1,0532	0,9270
0,1710	0,2308	0,0519	1,1602	1,1400	0,0576	0,2419	0,0855	1,0584	0,9077
0,1769	0,2094	0,0626	1,0523	0,9766	0,0675	0,2715	0,0907	0,9780	0,7611
0,0635	0,2611	0,1755	1,4753	1,0137	0,0649	0,0828	0,0659	1,0174	0,8795
0,0631	0,2660	0,1922	1,5642	1,0903	0,0654	0,0910	0,0708	1,0864	0,9531
0,0611	0,2610	0,2025	1,4347	1,0992	0,0664	0,0812	0,0588	1,1034	0,9642
0,0663	0,2411	0,2147	1,3273	1,0513	0,0510	0,0872	0,0606	1,0568	0,9444
0,0524	0,1729	0,2578	1,7812	1,2117	0,0533	0,2222	0,0651	0,9085	1,1469
0,0577	0,1909	0,2492	1,5053	1,2127	0,0488	0,2248	0,0613	0,9228	1,1733
0,0568	0,2181	0,2258	1,2826	1,2164	0,0459	0,2235	0,0636	0,9018	1,1313
0,0548	0,2302	0,2038	0,1262	1,2055	0,0568	0,2270	0,0677	0,9304	1,1280
0,068	0,6565	0,1357	2,0675	1,1720	0,0562	0,3007	0,0738	0,9187	1,1490
0,0635	0,5688	0,2101	1,5547	1,1641	0,0598	0,3015	0,0754	0,9448	1,2068
0,0590	0,6026	0,2049	1,1649	1,1663	0,0571	0,3119	0,0654	0,9419	1,1900
0,0534	0,2418	0,2201	1,1301	1,1693		0,3670	0,0720	0,9389	1,1966
0,0547	0,1168	0,1858	1,7807	1,2345		0,3353	0,0677	0,9472	1,0416
0,0583	0,1110	0,2419	1,5052	1,2312		0,3433	0,0637	0,8556	1,0601
0,0548	0,2023	0,2796	1,2208	1,2110		0,3389	0,065	0,9277	1,0494
0,0524	0,3186	0,2637	1,0685	1,2137		0,3372	0,0541	0,9204	1,2009
0,0514	0,3652	0,2610	2,0615	1,2181		0,0981	0,0566	0,9755	1,2039
0,0549	0,3776	0,2599	1,4550	1,219		0,0943	0,0634	0,9720	1,2009
0,0467	0,3846	0,2812	1,1688	1,1459		0,0957	0,0585	0,9576	1,2023
0,0574	0,8098	0,2624	1,1283	1,2286		0,0957	0,0679	0,9196	1,0576



RESUMIO

MENDONÇA, A. A. M. **Efeito citotóxico de diferentes materiais dentários sobre células de linhagem odontoblástica**. Araraquara, 2005, 123p. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

Resumo

A presente pesquisa avaliou o efeito citotóxico de diferentes materiais dentários sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 em cultura. Para isto, corpos-de-prova com dimensões de 4mm de diâmetro e 2 mm de profundidade foram confeccionados com os seguintes materiais: hidróxido de cálcio (Hydro C – Grupo HCa); RelyX Luting (Grupo RL); Vitrebond (Grupo VB); e RelyX Unicem (Grupo RU). Cada espécime foi imerso em meio de cultura não suplementado com soro fetal bovino (MC-SFB) e incubado pelos períodos de 24 horas ou 7 dias. Células odontoblastóides MDPC-23 foram semeadas (3×10^4 células/cm²) em pratos de acrílico com 24 compartimentos e incubados por 72 horas, sendo que após este período, o meio de cultura completo (DMEM) foi substituído pelos extratos obtidos de cada material experimental. Após incubação adicional de 24 horas, a atividade da enzima desidrogenase succínica das células foi avaliada através do teste de MTT. No grupo controle, o meio de cultura foi substituído pelo MC-SFB fresco (sem tratamento). Para os períodos de 24 horas, os grupos HCa, RL, VB e RU apresentaram valores de redução no metabolismo celular de 91,52%; 78,17%; 89,14%; e 2,64%, respectivamente, quando

comparados com o grupo controle (DMEM), o qual não reduziu o metabolismo celular. Com relação ao período experimental de 7 dias, os valores de redução na atividade metabólica para os grupos HCa, RL, VB e RU foram de 91,13%, 79,04%, 87,27% e 10,51%, respectivamente. Segundo a análise estatística de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Mann-Whitney não houve diferença entre os grupos HCa e VB, os quais foram os materiais mais citotóxicos em ambos os períodos avaliados. RU foi o cimento menos tóxico, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa com o grupo controle no período de 24 horas. O ranking decrescente de citotoxicidade para os períodos de 24 horas e 7 dias foi: HCa=VB>RL>RU=DMEM e HCa=VB>RL>RU>DMEM, respectivamente. Baseado nos dados obtidos, foi possível concluir que RU foi o material menos tóxico, sendo que a intensidade de seu efeito citopático foi diretamente relacionado com o período de avaliação. Para os materiais HCa, RL, VB, o intenso efeito citotóxico destes cimentos não foi influenciado pelos períodos de avaliação.

Palavras-chave: cimentos dentais; odontoblastos; solubilidade; citotoxicidade.



ABSTRACT

MENDONÇA, A. A. M. **Cytotoxic effects of different dental materials on the odontoblast cell line MDPC-23**. Araraquara, 2005, 123p. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”.

Abstract

The present *in vitro* study evaluated the cytotoxic effects of different dental materials on the odontoblast-like cells MDPC-23. For this purpose, round samples (2-mm thick and 4-mm in diameter) were prepared with the following experimental materials: calcium hydroxide (Hydro C – Group HCa); RelyX™ Luting Cement (Group RL); Vitrebond (Group VB); and RelyX™ Unicem (Group RU). The samples were placed in fresh culture medium with no fetal bovine serum (DMEM-FBS) and incubated for 24 hours or 7 days at 37°C with 5% CO₂, and 95% air. The odontoblast cells were plated (3×10^4 cells/cm²) in wells of five 24-wells dishes and incubated for 72 hours. After this period, the complete culture medium (DMEM) was replaced by the extracts obtained from every sample. The cells in contact with the extracts were incubated for additional 24 hours. The MTT Assay was carried out to evaluate the cell metabolism. In control group (DMEM) the nontreated fresh culture medium (DMEM-FBS) was applied on the cultured cells. At 24 hours period, the experimental materials HCa, RL, VB and RU decreased the mitochondrial respiration by: 91,52%; 78,17%; 89,14%; and 2,64%, respectively. At 7 days, the reduction of the cell metabolism for groups HCa, RL, VB and RU was: 91,13%; 79,04%; 87,27%; and 10,51%,

respectively. The statistical analysis of Kruskal-Wallis complemented by the Mann-Whitney test demonstrated there was no statistical difference between the groups HCa and VB which presented the highest cytotoxic effects on the MDPC-23 cells. On the other hand, no difference statistically significant was observed between RU and DMEM, at 24 hours period. The ranking of cytotoxicity observed at 24 hours and 7 days was: HCa=VB>RL>RU=DMEM and HCa=VB>RL>RU>DMEM, respectively. Based upon the scientific data presented in this *in vitro* study, it was concluded that RU presented the lower cytotoxic effects on the MDPC-23 cells. On contrary, HCa, RL and VB showed the highest cytotoxicity which was not time-dependent.

Keywords: dental cements; odontoblast; solubility; cytotoxicity.