



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ELAINE CRISTINA VOLTOLINI PONTES

**CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS RESINOSOS SOBRE
CÉLULAS OBTIDAS DA POLPA DE DENTES HUMANOS
(HDPCs) E ODONTOBLASTÓIDES (MDPC-23)**

Araraquara

2014



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ELAINE CRISTINA VOLTOLINI PONTES

**CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS RESINOSOS SOBRE
CÉLULAS OBTIDAS DA POLPA DE DENTES HUMANOS
(HDPCs) E ODONTOBLASTÓIDES (MDPC-23)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos A. de Souza Costa

Araraquara

2014

Pontes, Elaine Cristina Voltolini.

Citotoxicidade de cimentos resinosos sobre células obtidas da polpa de dentes humanos (HDPCs) e odontoblastóides (MDPC-23) / Elaine Cristina Voltolini Pontes - Araraquara: [s.n.], 2014.

81 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Cimentação 2. Odontoblastos 3. Cultura primária de células
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Disleide Silvia Valério Gounella CRB-8/5629

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

ELAINE CRISTINA VOLTOLINI PONTES

**CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS RESINOSOS SOBRE
CÉLULAS OBTIDAS DA POLPA DE DENTES HUMANOS
(HDPCs) E ODONTOBLASTÓIDES (MDPC-23)**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

2° Examinador: Prof. Dr. Gelson Luis Adabo

3° Examinador: Prof. Dr. Adriano Lima

Araraquara, 25 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES

ELAINE CRISTINA VOLTOLINI PONTES

NASCIMENTO: 19/11/1987 – Ribeirão Preto/SP

FILIAÇÃO: Aparecido Ribeiro Pontes

Maria Terezinha Voltolini Pontes

2007/2011 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2012/2014 Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Prótese), nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2012 Estágio Docência na disciplina de Protese Fixa

2013 Estágio Docência na disciplina de Materiais Restauradores Diretos

2013 Estágio Docência na disciplina de Materiais Aplicados à Prótese I

Dedicatória

A Deus

Por me dar a oportunidade de viver uma vida cheia de alegrias, conviver com pessoas maravilhosas, proporcionar a concretização de meus sonhos, e permitir mais uma oportunidade de evoluir.

Aos meus pais, Aparecido e Terezinha

Pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador durante o Mestrado **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pelos ensinamentos valiosos e pelo apoio para a realização de nossas pesquisas. Tenho-lhe como exemplo de pesquisador ético e responsável. Agradeço-lhe por todos os ensinamentos, pelo apoio e incentivo ao conhecimento.

À **Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling**, por todo ensinamento transmitido com muita paciência e dedicação.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela digníssima Diretora **Profª. Drª. Andréia Affonso Barreto Montandon** e pela Vice-Diretora **Profª. Drª. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Coordenadora **Profª. Drª. Ana Cláudia Pavarina** e pela Vice-Coordenadora **Profª. Drª. Renata Garcia Fonseca**.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela contribuição profissional e ensinamentos.

Aos colegas da turma de Mestrado em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **Diogo, Fernanda, Gabriel, Gabriela, Kátia, Lívia, Maria Silvia, Miriane, Norberto, Paula e Samira**.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara **Ana Paula Turrioni, Diana Soares, Fernanda Basso, Juliana Pirola, Leopoldina Almeida, Liege Montoro, Lucas Garcia e Taisa Pansani** pelos momentos que vivemos no laboratório e o prazer de aprendermos juntos.

Por um dia melhor

Esqueça os dias de nuvens escuras,
Mas lembre-se das horas passadas ao sol...
Esqueça as vezes em que você foi derrotado,
Mas lembre-se das suas conquistas e vitórias...
Esqueça os erros que já não podem ser corrigidos,
Mas lembre-se das lições que você aprendeu...
Esqueça as infelicidades que você enfrentou,
Mas lembre-se de quando a felicidade voltou...
Esqueça os dias solitários que você atravessou,
Mas lembre-se dos sorrisos amáveis que encontrou...
Esqueça os planos que não deram certo,
Mas lembre-se de sempre ter um sonho...
Aquele que crer alcança muito mais...

"Mude suas opiniões, mantenha seus princípios.
Troque suas folhas, mantenha suas raízes."

Victor Hugo

Pontes ECV. Citotoxicidade de cimentos resinosos sobre células obtidas da polpa de dentes humanos (HDPCs) e odontoblastóides (MDPC-23) [dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2014.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de cimentos resinosos quando aplicados sobre cultura de células odontoblastóides (MDPC-23) e pulpares humanas (HDPC). Os seguintes grupos foram formados: G1 - controle (sem tratamento); G2 - Rely X Luting 2; G3 - Rely X U200; G4 - Rely X ARC. Corpos de prova padronizados, preparados com os cimentos, foram imersos em 1 mL de meio de cultura (DMEM) por 24hs para obtenção dos extratos (DMEM + componentes liberados dos cimentos). Após aplicar os extratos sobre as células por 24hs, a viabilidade (MTT assay) e tipo de morte celular (Anexina/PI), bem como a morfologia das células (MEV) foram avaliados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis complementada por Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). A análise química dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Nos grupos G2, G3 e G4, observou-se redução de 95,8%, 31,5% e 22,7% na viabilidade das células MDPC-23, respectivamente. Redução de 89,4% para G2 e aumento em 11,3% e 29% para G3 e G4, respectivamente, foram observados para as HDPCs. Para as células MDPC-23, redução significativa de viabilidade ocorreu em G2 e G3 quando comparado à G1; todavia, para as HDPCs esta redução foi observada apenas em G2 ($p<0,05$). Para ambas as culturas usadas no estudo, ocorreu 100% de morte celular por necrose apenas em G2, onde o pH do extrato era ácido. Em G3, onde uma pequena quantidade de TEGDMA foi detectado no extrato, houve reduzida morte celular por necrose e discreta alteração morfológica nas células. Todavia, nenhum dano celular ocorreu em G4. De maneira geral, as células MDPC-23 são mais sensíveis do que as HDPCs. Concluiu-se que apenas o cimento Rely X Luting 2 causou intenso efeito citotóxico para ambas culturas de células pulpares usadas neste estudo. Rely X U200 apresentou discreta citotoxicidade, enquanto o cimento Rely X ARC não foi tóxico para as células pulpares em cultura.

Palavras-chave: cimentação, odontoblastos, cultura primária de células.

Pontes ECV. Citotoxicity of luting cements applied on human dental pulp cells (HDPCs) and odontoblast-like MDPC-23 cells [dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of luting cements on cultured MDPC-23 odontoblast-like cells and human dental pulp cells (HDPCs). The following groups were formed: G1 - control (no treatment), G2 - Rely X Luting 2, G3 - Rely X U200; G4 - Rely X ARC. Standard round specimens prepared with resin cements were immersed in 1 ml of culture medium (DMEM) for 24 hours to obtain the extract (DMEM + components released from the cement). After applying the extracts to the cells for 24 hours, the viability (MTT assay) and type of cell death (Annexin/PI) as well as cell morphology (SEM) were evaluated. The data obtained was submitted to Kruskal-Wallis statistical analysis complemented by Mann-Whitney test ($\alpha=5\%$). The chemical analysis of the extracts was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). In G2, G3 and G4, there was a reduction of 95.8 %, 31.5 % and 22.7 % in the MDPC-23 cells viability, respectively. A reduction of 89.4 % for G2, as well as an increase of 11.3 % and 29% for G3 and G4 was observed for the HDPCs, respectively. Significant reduction of MDPC-23 viability occurred for G2 and G3 compared to G1. However, for HDPCs this reduction was only observed in G2 ($p<0.05$). For both cell cultures used in this study, there was 10 % of cell death by necrosis only in G2, in which the pH of the extract was acid. In G3, where a small amount of TEGDMA was detected in the extracts, there was reduced cell death by necrosis and a discrete morphological alteration in cells. No cellular damage occurred in G4. In general, the MDPC-23 cells are more sensitive than HDPCs against the toxicity of resin cement components. It was found that only the Rely X Luting cement caused intense cytotoxic effect for both pulp cell cultures used in this study. Rely X U200 showed mild cytotoxicity, whereas the cement Rely X ARC was not toxic to the pulp cells.

Key Words: cementation, odontoblasts, primary cell culture.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Características Biológicas do Complexo Dentino-Pulpar	17
2.1.1	Polpa Dental	17
2.1.2	Dentina	19
2.2	Toxicidade de Monômeros Resinosos Presentes em Agentes para Cimentação Sobre Células Pulpares	20
2.3	Aspectos Biológicos dos Cimentos Resinosos Indicados para Cimentação de Restaurações Indiretas: Toxicidade e Alterações Pulpares	28
2.3.1	Estudos in vitro - Citotoxicidade de Cimentos com Base Resinosa	29
2.3.2	Estudos in vivo - Biocompatibilidade de Cimentos com Base Resinosa	33
3	PROPOSIÇÃO	36
4	MATERIAL E MÉTODO	38
4.1	Cultura de células MDPC-23	39
4.2	Obtenção da cultura primária HDPCs	39
4.3	Obtenção dos corpos de prova e grupos experimentais	40
4.4	Obtenção dos extratos	42
4.5	Procedimento experimental	43
4.6	Avaliação da viabilidade celular (Teste de MTT)	43
4.7	Análise da morfologia celular (MEV) e caracterização de partículas em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	44
4.8	Análise do tipo de morte celular	45
4.9	Análise Química dos extratos (HPLC)	45
4.10	Avaliação do pH dos extratos	46
5	RESULTADO	47
5.1	Avaliação da viabilidade celular (Teste de MTT)	48
5.2	Análise da morfologia celular (MEV) e caracterização de partículas em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	48

5.2.1	Análise da morfologia das células MDPC-23 (MEV)	48
5.2.2	Análise da morfologia das HDPCs (MEV)	51
5.2.3	Caracterização de partículas em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	53
5.3	Análise do tipo de morte celular	55
5.4	Análise Química dos extratos (HPLC)	58
5.5	Avaliação do pH dos extratos	61
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO – Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP (Processo: 296.630)	79

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A união de restaurações indiretas ao substrato dentário é baseada na utilização de um cimento, o qual deve apresentar características que assegurem a longevidade ao procedimento^{26, 31, 37, 49}. Dentro destas características, a biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar é uma propriedade primordial quando da seleção dos agentes cimentantes, especialmente se estes materiais serão aplicados sobre o assoalho cavitário profundo^{26, 37, 49}.

Nos casos específicos de preparação mecânica de dentes para receber uma restauração indireta ou uma coroa total, parte do tecido dentinário sadio é cortado expondo um tecido tubular permeável¹⁹⁻²⁰. Desta forma, a seleção de um agente cimentante ideal, o qual deve promover, em dentina profunda, uma união satisfatória entre a restauração e o elemento dental aliado à biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar, tem se tornado um grande desafio dentro da Odontologia Adesiva Moderna^{26, 37, 49}.

A adesão ao substrato dentinário é uma característica altamente desejável nos agentes cimentantes. Um cimento capaz de se aderir de forma micromecânica e/ou química com a dentina apresenta a vantagem de melhor selamento da interface dente/restauração, reduzindo a microinfiltração marginal, manchamento e recidiva de cárie, proporcionando longevidade à restauração^{9, 31, 49}. Estas características podem ser encontradas nos cimentos resinosos e nos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs), possibilitando, dessa maneira, a ampla utilização destes materiais na cimentação de restaurações indiretas^{9, 24, 26, 31, 37, 49}.

Sabe-se que quanto mais próximo da polpa, maior é a densidade e o diâmetro dos túbulos dentinários^{23, 29, 39}. Estas características estruturais da dentina fazem com que este substrato tubular apresente elevada umidade, a qual interfere na polimerização de materiais resinosos aplicados diretamente sobre ele^{23, 39, 41}. Assim, diversos monômeros residuais não polimerizados, tais como 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), tri etileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) e bisfenol a glicidil metacrilato (Bis-GMA) podem ser solubilizados de materiais resinosos^{1, 42}. Estes monômeros livres são capazes de se difundir através dos túbulos dentinários para atingir a câmara pulpar^{17, 21} e assim causar efeitos tóxicos sobre células da polpa em

cultura^{5, 32, 45, 51}. Quando em contato com o tecido pulpar, os monômeros resinosos podem desencadear reação inflamatória crônica e alterações na matriz extracelular^{7, 10}.

Há algumas décadas, foi demonstrado que a difusão transdentinária de monômeros é intensificada quando a dentina é condicionada com agentes ácidos previamente à aplicação do material resinoso^{10-11,17}. Particularmente quando sistemas adesivos foram aplicados sobre dentina em cavidades muito profundas preparadas em dentes humanos, a difusão transdentinária de monômeros em direção a polpa foi intensificada, o que resultou na desorganização do tecido pulpar e reação inflamatória persistente no local¹⁰. Contudo, quando um cimento resinoso autocondicionante foi usado para cimentar inlays em cavidades profundas confeccionadas em pré-molares humanos ocorreu discreta difusão de monômeros resinosos¹¹. Deste modo, protocolos de cimentação que não preconizam condicionamento ácido prévio da dentina parecem ser alternativas seguras para evitar agressão para o complexo dentino-pulpar¹¹.

Estudos recentes demonstraram que CIVMRs e cimentos resinosos autoadesivos promovem modificação na smear-layer^{23, 36}, resultando em adesão com a dentina sem a formação de longos tags de resina no interior dos túbulos dentinários¹¹. Na última década, alguns pesquisadores demonstraram que o CIVMR – Vitrebond, recomendado exclusivamente para forramento cavitário, não causou danos ao tecido pulpar quando o mesmo foi aplicado em cavidades profundas e muito profundas preparadas em pré-molares humanos íntegros¹². Resultado semelhante também foi observado para um cimento resinoso autoadesivo (o qual não requer pré-tratamento da dentina com agentes ácidos) usado para cimentação de restaurações inlays em cavidades muito profundas¹¹.

Poucos estudos têm sido realizados para avaliar a biocompatibilidade dos diferentes cimentos resinosos atualmente disponíveis no mercado odontológico. Assim, baseado no fato de que os cimentos resinosos atuais apresentam variadas composições químicas e distintos protocolos de aplicação, os quais podem influenciar os seus possíveis efeitos tóxicos para a polpa. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade de componentes liberados de cimentos

resinosos quando aplicados sobre uma cultura primária de células pulpares humanas (HDPCs) e células odontoblastóides MDPC-23.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão da literatura abordou, didaticamente, três tópicos de maneira individual. O primeiro refere-se às características biológicas do complexo dentino-pulpar, sendo que o segundo foi direcionado aos estudos de citotoxicidade de monômeros resinosos presentes na composição cimentos indicados para cimentação de próteses fixas indiretas. Por fim, o terceiro tópico abordou estudos relacionados aos aspectos biológicos que caracterizam a toxicidade e alterações pulpares causados por cimentos resinosos. Assim, buscou-se, através desta revisão da literatura, entender os mecanismos envolvidos nas alterações do complexo dentino-pulpar decorrentes de injúrias impostas por cimentos resinosos, bem como a relação entre a solubilização e difusão transdentinária de componentes resinosos e seus efeitos negativos sobre as células pulpares.

2.1 Características Biológicas do Complexo Dentino-Pulpar

Dentina e polpa compartilham mesma origem embrionária, a partir da papila dental, tendo, dessa forma, origem ectomesenquimal. Ambos tecidos apresentam desenvolvimento intimamente relacionado, visto que as células da polpa sintetizam matriz dentinária e mantém seus prolongamentos citoplasmáticos dentro dos túbulos presentes na própria dentina. Por sua vez, o substrato dentinário protege o tecido pulpar de injúrias externas. Por esta razão, dentina e polpa passaram a não ser consideradas como estruturas isoladas, sendo então denominadas de complexo dentino-pulpar^{23, 40}.

2.1.1 Polpa Dental

Histologicamente, a polpa dental humana é constituída por tecido conjuntivo frouxo especializado, o qual apresenta camadas distintas e bem definidas: odontoblástica; acelular; rica em células; e camada central da polpa².

A camada odontoblástica é constituída por células denominadas odontoblastos, os quais encontram-se em monocamada, dispostos em forma de

paliçada, revestindo toda a periferia da polpa. Morfologicamente, os odontoblastos são cilíndricos na porção coronária e cuboide na porção radicular do dente, apresentando núcleo polarizado apical (próximo à camada acelular). Os odontoblastos são responsáveis pela formação e manutenção da dentina através da síntese contínua de pré-dentina, a qual compreende em uma camada de 10 a 40 µm de espessura de matriz extracelular não mineralizada, composta basicamente por colágeno tipo I e proteínas não colagenosas, desde a odontogênese e ao longo de toda a vida do dente^{2, 23}. À medida que a pré-dentina é sintetizada, os odontoblastos deslocam-se em direção ao centro da polpa, permanecendo ligados à matriz através de prolongamentos odontoblásticos, os quais conferem à dentina sua característica tubular²³. Por serem células secretoras de matriz proteica, principalmente de colágeno tipo I, os odontoblastos apresentam amplo complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bastante desenvolvido, além de grande número de mitocôndrias uniformemente espalhadas por todo citoplasma. O prolongamento odontoblástico é praticamente desprovido de organelas citoplasmáticas, contudo apresenta citoesqueleto e ampla quantidade de vesículas secretoras^{8, 41}.

Logo abaixo da camada odontoblástica, com espessura de aproximadamente 40 µm, existe a camada sub-odontoblástica, a qual divide-se em duas porções: a camada acelular e a rica em células. A camada acelular é caracterizada pela presença de um plexo nervoso denominado Plexo de Rashkow, o qual é constituído, principalmente por fibras amielínicas, as quais originam-se de feixes nervosos centrais que alcançaram a polpa através do forame apical. Parte das fibras nervosas deste plexo atravessa a camada de odontoblastos e atingem a pré-dentina e a dentina, penetrando em até 100 µm o interior dos túbulos dentinários^{22, 40}.

Abaixo da camada acelular, localiza-se a camada rica em células, mais facilmente observada na porção coronária da polpa. Esta camada é constituída, em sua maioria, por células mesenquimais indiferenciadas (dental pulp stem cells). Estas células funcionam como uma reserva biológica para a polpa, uma vez que os odontoblastos não fazem mitose e, por esta razão, são considerados como células terminais. Assim, quando estas células morrem por senilidade (apoptose) ou quando expostos a fatores agressores, as células mesenquimais indiferenciadas apresentam o potencial de migrar e diferenciar em células odontoblastóides, substituindo os odontoblastos primários^{14, 35}.

Na região central da polpa, as células mais abundantes são os fibroblastos, que encontram-se espalhados, homoganeamente, por toda a polpa dental. Há também outros tipos celulares, como células mesenquimais indiferenciadas, em menor quantidade que a encontrada na camada rica em células, além de vasos sanguíneos e feixes nervosos².

2.1.2 Dentina

A dentina é uma estrutura parcialmente mineralizada, avascular e acelular, constituída por cerca de 70% de componentes inorgânicos/peso, caracterizados principalmente, por cristais de hidroxiapatita. Sabe-se que este tecido também contém aproximadamente 20% de componentes orgânicos, em especial colágeno do tipo I, além de proteínas não colagenosas como proteoglicanas, glicosaminoglicanas, fatores de crescimento, catepsinas, metaloproteinases e etc. Sabe-se, também, que a dentina contém 10% de água^{23, 30}.

A principal característica estrutural da dentina é a presença de túbulos dentinários em toda sua extensão, desde a junção amelo-dentinária até a pré-dentina. Os túbulos dentinários originam-se devido a síntese, deposição e mineralização da matriz dentinária ao redor dos prolongamentos odontoblásticos. Os túbulos estabelecidos estão dispostos de maneira convergente em direção à polpa, de forma que, quanto mais próximo da polpa, maior a quantidade e seu diâmetro. Numa dentina com até 1 mm de distância da polpa, a densidade de túbulos pode variar de 38.000 a 45.000 por mm², o que corresponderia a uma cavidade profunda. Uma densidade de 19.000 a 35.000 por mm² pode ser observada na dentina com mais de 1 mm de distância da polpa, correspondendo a uma cavidade média. Nas situações de cavidade profunda e cavidade média, o diâmetro dos túbulos pode variar de 2,5 µm a 0,8 µm, respectivamente^{23, 29, 39}.

Os túbulos dentinários são preenchidos por fluido, prolongamentos odontoblásticos, fibras nervosas, fibrilas de colágeno e outros componentes em menor quantidade. O fluido dentinário exsuda da polpa em direção à junção amelo-dentinária, o que ocorre devido à pressão positiva exercida pelos vasos sanguíneos da polpa. Esta presença de fluido dentinário caracteriza a permeabilidade deste tecido dentário tubular²³.

A dentina pode ser classificada em Primária, Secundária e Terciária. A dentina formada entre o início da odontogênese e a completa erupção do elemento dental é chamada de dentina Primária^{2, 14, 40-41}. A partir de então, inicia-se a deposição de dentina Secundária, a qual é sintetizada em um ritmo mais lento que a dentina primária^{2, 14, 30, 40}. Ambas, Primária e Secundária, são estruturalmente semelhantes. A dentina Terciária é sintetizada frente a algum estímulo patológico do meio externo, como lesões de cárie e até mesmo procedimentos restauradores^{2, 14, 30, 41}. Esta dentina pode ser reacional ou reparadora. A dentina reacional é sintetizada pelos odontoblastos pré-existentes frente a estímulos de baixa intensidade. Neste caso, os odontoblastos residentes sintetizam matriz dentinária rapidamente, dando origem a uma dentina que contém túbulos irregulares e tortuosos em seu interior^{2, 14}. Por outro lado, a dentina reparadora é formada frente a estímulos externos intensos capazes de levar a morte dos odontoblastos. Então, células mesenquimais indiferenciadas da camada rica em células entram em um processo de diferenciação em novos odontoblastos, agora chamados de células odontoblastóides^{2, 14}. Assim, a matriz de dentina reparadora é sintetizada pelas células odontoblastóides de maneira heterogênea. Neste caso, como há necessidade de diferenciação de células mesenquimais em células odontoblastóides, ocorre redução na celularidade da polpa, o que pode limitar sua capacidade de reparação^{2, 14}.

2.2 Toxicidade de Monômeros Resinosos Presentes em Agentes para Cimentação Sobre Células Pulpaes

Os cimentos resinosos indicados para cimentação de restaurações indiretas são constituídos, basicamente, por partículas de sílica, monômeros, iniciadores, catalizadores, pigmentos e opacificadores. A composição pode variar de acordo com o tipo de cimento, sistema de ativação e indicação de uso clínico. Diversos monômeros resinosos podem ser utilizados na composição dos cimentos, dentre eles os principais são Bis-GMA, TEGDMA e HEMA, os quais variam de 10 a 20%/peso para o Bis-GMA e TEGDMA, e de 5 a 15%/peso para o HEMA. Quanto ao peso molecular (PM) destes monômeros, sabe-se que o HEMA, TEGDMA e Bis-

GMA apresentam PM de 130,14 g/mol, 286,32 g/mol e 512,59 g/mol, respectivamente.

Muitos pesquisadores avaliaram a citotoxicidade de monômeros resinosos sobre diferentes tipos celulares, sendo que os primeiros estudos com este objetivo datam da década de 90. Ratanasathien et al.⁴² (1995) levantou a hipótese de que os monômeros resinosos poderiam atuar de forma sinérgica com outros monômeros, ou seja, se avaliados de forma isolada poderiam apresentar comportamento distinto daquele observado quando em conjunto com outros monômeros. Para isso, os autores analisaram a citotoxicidade dos monômeros HEMA, TEGDMA, Bis-GMA e UDMA isoladamente e em combinações binárias de HEMA e Bis-GMA, Bis-GMA e TEGDMA, TEGDMA e UDMA sobre células Balb/c 3T3 (fibroblastos). A citotoxicidade foi determinada após 24 ou 72 hs após a exposição das células aos monômeros. Para isto, foi utilizado o teste de MTT, o qual consiste em um teste colorimétrico em que o sal de tetrazolium presente no sal de MTT reage com a enzima desidrogenase succinica, presente apenas nas mitocôndrias das células viáveis, produzindo cristais de coloração azul arroxeada, denominados de cristais de formazan. O resultado observado neste estudo, para os monômeros isolados, foi um padrão decrescente da citotoxicidade de Bis-GMA (mais tóxico) > UDMA > TEGDMA >>> HEMA (menos tóxico), para ambos os períodos experimentais. Os resultados deste estudo para as combinações mostraram que houve sinergismo na citotoxicidade das células para a combinação de Bis-GMA (25 µmol/L) e HEMA (1000 a 2500 µmol/L) em 24 hs. Desta forma, os autores concluíram que a citotoxicidade dos monômeros pode variar de acordo com as interações entre eles, atuando de maneira sinérgica sobre a viabilidade celular.

No ano seguinte, Gerzina, Hume¹⁷ (1996) avaliaram a difusão de monômeros provenientes de materiais odontológicos resinosos, tais como adesivos e resinas compostas, através da dentina de terceiros molares humanos. Para tanto, cavidades foram confeccionadas na face oclusal de terceiros molares humanos, os quais tiveram suas coroas adaptadas a dispositivos acrílicos contendo água; em seguida, as cavidades foram restauradas utilizando ou não um sistema adesivo. A água presente nos dispositivos acrílicos foi coletada em diferentes tempos, após o procedimento restaurador, e avaliadas quanto à presença de monômeros resinosos, utilizando cromatografia líquida de alta potência (HPLC) e espectrometria de massa.

Os resultados deste estudo mostraram que os monômeros resinosos, tanto do sistema adesivo (HEMA) como da resina composta (TEGDMA), são capazes de se difundir através da dentina para atingir a câmara pulpar.

Com a hipótese de que a espessura de dentina remanescente pode interferir na difusão de HEMA e TEGDMA através deste tecido tubular para alcançar a cavidade pulpar, Hamid, Hume²¹ (1997) utilizaram o modelo experimental proposto por Gerzina, Hume¹⁷ (1996), porém as cavidades foram confeccionadas com diferentes profundidades. A água presente no dispositivo acrílico foi coletada após 30 dias do procedimento restaurador adesivo. Os autores deste estudo observaram que a difusão dos monômeros através da dentina variou de acordo com a espessura do remanescente dentinário, sendo que menores espessuras de dentina (0,4 a 0,6 mm) permitiram maior difusão de monômeros em comparação a dentina mais espessa (3,4 a 3,6 mm). Este resultado foi mais expressivo para o HEMA, cujo PM é menor em relação ao demais monômeros avaliados. Porém, a presença de TEGDMA na câmara pulpar também foi observada, independente da espessura de dentina remanescente. No entanto, os autores não observaram nas câmaras pulpares a presença de Bis-GMA, monômero com maior PM avaliado neste estudo *in vitro*.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos monômeros resinosos, Bouillaguet et al.⁵ (1998), avaliaram a influência da permeabilidade dentinária sobre a citotoxicidade de sistemas adesivos em cultura primária de células pulpares. Para isso, os autores utilizaram discos de dentina com diferentes permeabilidades (baixa, média e alta), os quais receberam um sistema adesivo na superfície oclusal. Foi observado que a toxicidade dos sistemas adesivos foi proporcional à permeabilidade dos discos de dentina, comprovando a hipótese que a permeabilidade deste tecido apresenta relação direta com a intensidade de difusão dos monômeros resinosos e sua consequente toxicidade sobre células pulpares.

Geurtsen et al.¹⁸ (1998) investigaram a citotoxicidade de 35 componentes monoméricos, aditivos iniciadores e estabilizadores presentes em resinas compostas comerciais, dentre eles os monômeros Bis-GMA, TEGDMA e HEMA. Os produtos foram aplicados sobre células imortalizadas 3T3 e três culturas primárias provenientes da polpa, gengiva e ligamento periodontal. Neste estudo, os autores testaram diferentes concentrações dos monômeros e identificaram a dose que

ocasionaria a morte de 50% das células por meio de um teste de identificação do DNA das células viáveis. Os resultados encontrados neste estudo foram que os monômeros Bis-GMA e TEGDMA apresentaram citotoxicidade severa enquanto que o monômero HEMA apresentou citotoxicidade moderada. Este estudo também demonstrou que as células de cultura primária de polpa e de ligamento periodontal são mais sensíveis do que as células imortalizadas 3T3 e a cultura primária de gengiva frente a agressões advindas de materiais resinosos.

Em estudo realizado por Stanislawski et al.⁴⁸ (2003), os autores investigaram por qual mecanismo o monômero TEGDMA induziria citotoxicidade celular. Para isto, foram utilizadas culturas de fibroblastos de gengiva e de polpa humana. As células foram expostas por 24hs a concentrações do monômero que variaram de 0,1 mM a 3 mM. Em seguida, foram realizados testes para a determinação da viabilidade celular e depleção da glutatona celular (GSH), além da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tratadas ou não com antioxidantes N-acetilcisteína (NAC), Ascorbato e Trolox (análogo da vitamina E). Para os testes de viabilidade celular e depleção da GSH, foi demonstrado que o TEGDMA exerceu efeito tóxico dose-dependente sobre as células e que a citotoxicidade celular foi relacionada com a diminuição precoce e drástica dos valores de GSH celular, os quais foram reduzidos quase que completamente em 6 hs. Quando estes resultados foram comparados com aqueles os obtidos na presença de antioxidantes, foi observado que os três antioxidantes testados foram capazes de prevenir a citotoxicidade exercida pelo TEGDMA e inibir parcialmente a depleção da GSH. De maneira geral, foi observado que o início de formação de ROS pelas células aconteceu entre 3 e 4 hs após exposição ao TEGDMA. Quando as células foram tratadas com antioxidantes, houve inibição da formação de radicais livres, especialmente para o antioxidante Trolox, o qual foi capaz de inibir completamente a produção de ROS.

Com o propósito de investigar a origem da produção de ROS em células expostas ao TEGDMA, Lefeuvre et al.²⁸ (2005) expuseram células de gengiva humana a concentrações de 0; 1; 1,25 e 1,5 mM de TEGDMA por tempos de 0 a 6 hs, as quais foram co-tratadas ou não com Trolox. Os autores avaliaram a liberação de LDH, presença de ATP e GSH, a ocorrência de peroxidação lipídica (liberação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS), bem como o possível dano

mitocondrial (potencial de membrana mitocondrial). Os resultados deste estudo mostraram que após 30 minutos de contato das células com TEGDMA, ocorreu depleção completa de GSH acompanhada de uma redução significativa de ATP. Os resultados de liberação de LDH e de TBARS mostraram que a peroxidação lipídica ocorre de 3 a 4 hs de contato das células com o monômero em estudo. Quanto aos resultados de liberação de LDH e de potencial de membrana mitocondrial, foi demonstrado que o monômero TEGDMA induziu dano mitocondrial nas células analisadas. Desta forma, os autores sugeriram que a morte celular induzida pelo TEGDMA é decorrente da peroxidação lipídica e dano mitocondrial nas células.

O estudo realizado por Lee et al.²⁷ (2006) teve como objetivo avaliar se o estresse oxidativo influenciaria na mutagenicidade, bem como na taxa de apoptose causada por monômeros resinosos. Neste estudo, foram realizadas diluições dos monômeros glycidyl methacrylate (GMA), TEGDMA e HEMA em meio de cultura, os quais foram colocados em contato com as células V79-4 (fibroblastos) e RPC-C2A (células pulpares) pelo período de 24hs. Além disso, alguns grupos receberam tratamento adicional com NAC. Após este período, as células foram analisadas quanto a sua viabilidade (teste de MTT); a mutagenicidade foi avaliada pela contagem de micronúcleos nas células V79-4 e fragmentação de DNA nas células RPC-C2A, sendo que o tipo de morte celular foi determinada por citometria de fluxo (Anexina V/PI), a qual teve como controle positivo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Ficou demonstrado que todos os monômeros foram citotóxicos, genotóxicos e levaram a apoptose das células de maneira dose-dependente. Os autores determinaram um ranking de citotoxicidade, em ordem decrescente: GMA > TEGDMA > HEMA. A NAC protegeu de maneira significativa as células contra a citotoxicidade, genotoxicidade e apoptose induzida pelos monômeros. Finalmente, os autores sugeriram que o estresse oxidativo é responsável pela mutagenicidade e apoptose causada pelos monômeros resinosos estudados.

Paranjpe et al.³⁸ (2007) estudaram o efeito de antioxidantes sobre células pulpares expostas ao HEMA. Neste estudo, células pulpares de ratos e de humanos, bem como células mononucleares (linfócitos e monócitos), foram expostas a três concentrações de HEMA e a tratamentos com NAC, vitamina C e E. Foi realizado, ainda, a indução da diferenciação de células mesenquimais em células odontoblastóides, através do cultivo em meio de cultura suplementado com β -

glicerofosfato (10 mM) e ácido ascórbico (50 µg/mL) ou a ambos mais dexametasona (10^{-8} M). As células foram avaliadas quanto a apoptose (Anexina V/PI), produção de fosfatase alcalina (ALP), expressão de VEGF (ELISA), bem como de colágeno tipo I, osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e sialoproteína da dentina (DSPP) por RT-PCR. Os resultados deste estudo mostraram que a morte celular estava relacionada com o grau de diferenciação celular de acordo com o tipo de tratamento recebido para diferenciação, de maneira que houve aumento da proliferação das células tratadas com HEMA e NAC. Assim, observou-se que a NAC foi capaz de proteger as células pulpares contra a apoptose induzida por HEMA. Houve aumento da produção de ALP nas células quando a NAC estava presente. Nos diferentes estágios de diferenciação, quando a NAC estava presente, houve aumento da expressão de colágeno tipo I, OPN, OCN e DSPP. Dessa forma, os autores sugeriram que para reduzir os efeitos tóxicos de materiais resinosos, seria interessante utilizar a NAC imediatamente antes ou juntamente com a aplicação destes tipos de produtos odontológicos.

Num estudo recente, Bakopoulou et al.⁴ (2011) avaliaram os efeitos do HEMA e TEGDMA na diferenciação odontoblástica de células tronco da polpa dentária. Para isto, uma cultura primária de células da polpa de dentes decíduos foi estabelecida e caracterizada por marcadores de células tronco, utilizando para isto citometria de fluxo. Então, as células foram semeadas em placas de 96 wells e expostas a concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 mM de HEMA ou a concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1, 2, 3 e 5 mM de TEGDMA pelos períodos de 24, 48 ou 72 hs. As células foram então analisadas quanto à viabilidade (teste MTT). Além disso, as células foram induzidas à diferenciação odontogênica mediante tratamento com meio contendo dexametasona, KH_2PO_4 , β -glicerofosfato e ácido ascórbico e ao mesmo tempo expostas às diferentes concentrações dos monômeros por três semanas (exposição a longo prazo). Em um segundo estudo, as células foram expostas apenas a concentrações de 2 e 1 mM de HEMA e TEGDMA, respectivamente, pelo período de 72 hs (exposição de curto prazo), sendo que após este tempo o meio de cultura foi substituído por meio de diferenciação odontogênica. Todos os grupos com células induzidas à diferenciação foram analisados quanto à mineralização por Alizarin Red, atividade de ALP, expressão de DSPP por imunohistoquímica, e quanto a expressão gênica de sialoproteína óssea (BSP), OCN

e DSPP por RT-PCR. Os autores observaram que a exposição (a longo prazo) das células a concentrações não tóxicas de HEMA e TEGDMA atrasaram significativamente os processos de diferenciação e mineralização das células e que a exposição a altas concentrações destes monômeros inibiram quase completamente a formação de nódulos de mineralização. A expressão gênica de BSP, OCN, ALP e DSPP também foram reduzidas significativamente.

Com o objetivo de avaliar o potencial inibidor do TEGDMA sobre a mineralização dentinária, Galler et. al.¹⁵ (2011) realizaram um estudo, no qual células de cultura primária da polpa humana foram expostas às concentrações de 0,0 (controle); 0,3; 1; e 3 mM do monômero por períodos de 4, 8, 12, 24, 48 e 96 hs. Então, as células foram avaliadas quanto à viabilidade e proliferação por meio dos protocolos de MTT e quantificação de DNA, respectivamente. Foi analisado, ainda, por RT-PCR, a expressão gênica de colágeno tipo I, ALP, BSP, OCN, Runx 2 e DSPP. A atividade de ALP foi determinada, sendo que a deposição de nódulos de mineralização foi avaliada por Alizarin Red. Os resultados deste estudo mostraram que houve diferença significativa para 1 e 3 mM de TEGDMA sobre a viabilidade e proliferação celular; além disso, a redução na expressão gênica foi significativa para todos os genes testados, exceto para colágeno tipo I após 4 hs e DSPP após 8 hs, ambos na concentração de 3 mM. Os autores observaram que quando a concentração de 0,3 mM de TEGDMA foi aplicada por 14 dias sobre as células, houve redução significativa da atividade de ALP e de deposição de nódulos de mineralização.

Ainda neste ano, Trubiani et. al.⁵⁰ (2011) avaliaram o efeito do HEMA aplicado em cultura células pulpares humanas, contendo uma sub-população de células tronco. Neste estudo, as células foram cultivadas e expostas a duas concentrações de HEMA (3 e 5 mM) pelos períodos de 24, 48 e 72 hs. Após estes períodos, as células foram avaliadas quanto às características morfológicas (microscopia de luz), viabilidade (Trypan Blue e MTT) e expressão de IL-6 e IL-8 (ELISA). Os autores observaram que o número de células viáveis remanescentes foi tempo-dependente, sendo que aumento significativo da produção de IL-6 e IL-8 ocorreu de maneira dose-dependente.

Em estudo recente desenvolvido por Chang et al.⁶ (2012), os autores avaliaram os efeitos do TEGDMA sobre a expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) e

produção de prostaglandinas (PGE) por células pulpares humanas em cultura. Para isto, células foram expostas às concentrações de 0,1; 1; 2,5 e 5 mM do monômero durante 24 hs. Após este período, as células foram analisadas quanto à viabilidade celular (teste de MTT), fase do ciclo celular (G0/G1, G2/M e S) e tipo de morte celular - células necróticas, células apoptóticas, células viáveis e células pré-apoptóticas (citometria de fluxo), expressão gênica de COX-2 (RT-PCR) e produção de PGE₂ e PGE_{2α} (ELISA). Os resultados deste estudo mostraram que as concentrações iguais ou maiores a 1 mM de TEGDMA exerceram citotoxicidade significativa sobre as células pulpares humanas. Quanto ao ciclo celular, todas as concentrações avaliadas foram capazes de reduzir a porcentagem de células em G0/G1 e aumentar em G2/M. Além disso, a concentração de 1 mM do monômero reduziu a porcentagem de células em S, sendo que a concentração de 5 mM aumentou. Quanto ao tipo de morte celular, a concentração de 5 mM de TEGDMA foi capaz de aumentar a porcentagem de células necróticas e apoptóticas, bem como de reduzir a porcentagem de células viáveis. Quanto à produção de prostaglandinas, as concentrações de 2,5 e 5 mM causaram intenso aumento na produção de PGE₂ e PGE_{2α} pelas células pulpares em cultura. A expressão gênica de COX-2 foi levemente aumentada na concentração de 1 mM, porém super-expressa na concentração de 2,5 mM. Deste modo, os autores concluíram que o monômero TEGDMA exerce efeito tóxico sobre as células pulpares, com conseqüente desregulação do ciclo e indução de morte celular, além de desencadear um processo inflamatório.

Ainda neste mesmo ano, Altintas, Usumez¹ (2012) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a eluição de TEGDMA a partir de cimentos resinosos indicados para cimentação de restaurações indiretas. Para tanto, foram utilizados quarenta terceiros molares hígidos, nos quais foram confeccionadas cavidades de classe I. Restaurações inlay de cerâmica foram confeccionadas e cimentadas nas cavidades, utilizando cimentos convencionais (Variolink II, Rely X ARC ou Resilute) ou um cimento autoadesivo (Rely X Unicem). Os dentes foram armazenados em etanol a 75% e os eluatos foram avaliados quanto a presença de TEGDMA por HPLC nos períodos de 10 minutos, 1 h, 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Os resultados deste estudo mostraram que em todos os períodos analisados, as concentrações do TEGDMA eluidas foram maiores para Resilute > Rely X ARC > Rely X Unicem >

Variolink II. Além disso, os autores demonstraram a ocorrência de aumento progressivo na liberação de monômero com o tempo de análise.

2.3 Aspectos Biológicos dos Cimentos Resinosos Indicados para Cimentação de Restaurações Indiretas: Toxicidade e Alterações Pulpare

Existe um paradigma clássico na literatura científica quanto a avaliação biológica de um novo material odontológico, que vai desde estudos iniciais in vitro, passando por estudos in vivo em animais e humanos, e, por fim, os estudos clínicos. Os estudos in vitro utilizando células em cultura demonstram, de maneira inicial, o potencial citotóxico de um novo material experimental. Este tipo de estudo pode ser hierarquizado em testes diretos e indiretos, sendo que nestes últimos são utilizadas barreiras semi-permeáveis (dentina, agar ou filtros), cujo objetivo principal é mimetizar situações clínicas. Já os estudos in vivo determinam a biocompatibilidade do material, os quais podem ser realizados pela a implantação do material em tecido subcutâneo de animais, ou mesmo sua aplicação em dentes, seja de animais ou de humanos⁵².

Poucos estudos estão disponíveis na literatura científica sobre citotoxicidade e alterações pulpare desencadeadas por cimentos resinosos indicados para cimentação final de restaurações indiretas. Os materiais resinosos abordados nesta revisão da literatura quanto aos seus aspectos biológicos, foram os cimentos Rely X Luting 2 (CIVMR) e os cimentos resinosos Rely X U200 (autoadesivo) e Rely X ARC (convencional). Tanto nos cimentos autoadesivos como no CIVMR, não está indicado pré-tratamento da dentina, enquanto que para a cimentação com cimento convencional é indicado que se realize um condicionamento ácido do substrato dentinário com ácido fosfórico 37%, seguido de lavagem abundante e posterior aplicação de um agente adesivo. O cimento Rely X ARC foi desenvolvido para ser utilizado em associação com o agente adesivo Single Bond ou com o Adper Single Bond 2 (3M/ESPE).

2.3.1 Estudos in vitro - Citotoxicidade de Cimentos com Base Resinosa

Souza et al.⁴⁷ (2006) avaliaram a citotoxicidade in vitro, bem como a biocompatibilidade in vivo de diferentes CIVMRs. Este estudo foi dividido em dois experimentos, sendo o primeiro com objetivo avaliar a citotoxicidade direta de CIVMRs sobre células odontoblastóides MDPC-23. Os materiais avaliados foram: CIVMR restaurador - Vitremer, CIVMR para forramento cavitário - Vitrebond e CIVMR para cimentação - Rely X Luting (3M/ESPE). Os materiais foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante e inseridos em uma matriz de dimensões padronizadas (2 mm altura e 4 mm diâmetro). Foram confeccionadas trinta amostras por grupo, as quais foram submersas em DMEM por períodos de 24, 48 ou 72 hs para a obtenção dos extratos. Decorridos os períodos estabelecidos, 1 mL do extrato foi colocado por mais 24 hs em contato com as células previamente cultivadas e avaliadas quanto a viabilidade (teste de MTT). Os resultados demonstraram que Vitrebond foi o material que mais reduziu a viabilidade celular, apesar de todos os materiais avaliados terem exercido efeito citotóxico significativo sobre as células nos períodos avaliados. Em geral, os extratos obtidos em 24 hs foram menos tóxicos que os obtidos em 48 e 72 hs. Desta forma, os autores concluíram que o CIVMR para forramento cavitário (Vitrebond) foi o mais citotóxico para as células MDPC-23.

No ano seguinte, utilizando metodologia semelhante à Souza et al.⁴⁹ (2006), Mendonça et al.³⁴ (2007) avaliaram a citotoxicidade do hidróxido de cálcio, Vitrebond, Rely X Luting e Rely X Unicem (3M/ESPE) sobre células MDPC-23 em cultura. Para tanto, os materiais foram manipulados de acordo com as especificações dos fabricantes e inseridos em matrizes com dimensões padronizadas (2 mm altura e 4 mm diâmetro). A reação de presa do material foi química para o hidróxido de cálcio (2 min) e Rely X Luting (10 min), ou fotoativada para o Vitrebond (30 seg) e o Rely X Unicem (20 seg). Os corpos de prova obtidos foram imersos em DMEM por 24 hs ou 7 dias, para a obtenção dos extratos. As células MDPC-23 previamente cultivadas foram colocadas em contato com os extratos de cada material por 24 hs e analisadas quanto a sua viabilidade (teste de MTT). Ficou demonstrado que, para o período de 24 hs, houve redução significativa da viabilidade celular de 91,52%, 81,14% e 78,17% para hidróxido de cálcio,

Vitrebond e Rely X Luting, respectivamente. Para o período de 7 dias, a redução da viabilidade celular foi de 91,13%, 87,27%, 79,04% e 10,51% para o hidróxido de cálcio, Vitrebond, Rely X Luting e Rely X Unicem, respectivamente. Dessa forma, os autores concluíram que o cimento resinoso Rely X Unicem foi o que causou menor efeito tóxico para as células MDPC-23.

A genotoxicidade e a citotoxicidade de diversos cimentos odontológicos foram estudadas por Bakopoulou et al.³ (2009). Neste estudo, foram avaliados cimentos de ionômero de vidro (CIV) Ketac Cem (3M/ESPE) e GC Fuji I (GC Corp), os CIVMRs Rely X Luting (3M/ESPE) e Vitrebond (3M/ESPE) e cimentos resinosos Variolink II (Ivoclar-Vivadent) e Panavia F 2.0 (Kuraray). Para isto, os materiais foram manipulados conforme a orientação do fabricante e inseridos em matrizes (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura). Após a presa do material, os corpos de prova foram imersos em meio de cultura por 24 hs. Foi realizado ajuste do pH (7,2 a 7,3) e diluições seriadas dos extratos obtidos, os quais foram aplicados sobre uma cultura de linfócitos humanos. As células foram avaliadas quanto à genotoxicidade, por meio dos testes de cromátides irmãs (SCE) e aberrações cromossômicas (CA) e quanto à citotoxicidade pelo teste de proliferação celular. Os autores observaram que os extratos causaram efeitos genotóxicos sobre as células de maneira dose-dependente. Os extratos dos CIVMRs e cimentos resinosos causaram danos mais severos que os extratos dos CIVs, aumentando significativamente a frequência de SCE e CA e diminuindo a proliferação celular. De maneira geral, houve um padrão quanto a genotoxicidade e a citotoxicidade, em ordem decrescente: Vitrebond > Rely X Luting > Panavia F 2.0 > Variolink II > Ketac Cem = GC Fuji I. Assim, este estudo concluiu que os extratos dos CIVMRs e dos cimentos resinosos causaram maiores efeitos genotóxicos do que os extratos dos CIVs.

A citotoxicidade de materiais para cimentação foi estudada por Schmid-Schwap et al.⁴⁴ (2009). Neste estudo, os cimentos avaliados foram divididos em quatro categorias: (I) cimento resinoso 1 (Nexus 2 - presa dual ou presa química, Nexus 2 - presa dual ou química + adesivo), (II) cimento resinoso 2 (Variolink II - presa dual ou química, Variolink II - presa dual ou química + adesivo), (III) cimento resinoso autoadesivo (RelyX Unicem - presa dual ou química, Maxcem - presa dual ou química) e (IV) cimentos com união química (Fosfato de Zinco, Panavia 21, Fuji CEM, Durelon). Os materiais experimentais foram manipulados de acordo com o

fabricante, inseridos em uma matriz padronizada (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) e polimerizados de acordo com cada grupo. Parte das amostras obtidas foram armazenadas em meio de cultura (10 mL por amostra) pelo período de 7 dias. As amostras confeccionadas imediatamente (frescas) ou armazenadas foram colocadas, por 72 hs, diretamente sobre células L929 previamente cultivadas. Após o período experimental, as amostras e o sobrenadante foram removidos, as células que continuaram aderidas ao fundo do well foram analisadas quanto ao número por citometria de fluxo. Os resultados deste estudo demonstraram que as amostras frescas apresentaram citotoxicidade significativamente maior que as armazenadas por 7 dias, para todos os cimentos testados. Quando foi comparada a citotoxicidade do mesmo cimento variando o tipo de presa, observou-se que os cimentos submetidos à presa dual foram menos citotóxicos que os submetidos à presa química. Houve leve aumento na citotoxicidade dos cimentos nos grupos com adesivo. Com base nos dados obtidos, os autores elencaram os cimentos de acordo com a citotoxicidade, de maneira crescente: Nexus 2 (presa dual), Variolink II (presa dual), Nexus 2 (presa química), Fosfato de Zinco, Rely X Unicem (presa dual), Panavia 21, Fujicem, Durelon, Variolink II (presa química), Rely X Unicem (presa química), Maxcem (presa dual) e Maxcem (presa química). Assim sendo, os autores concluíram que os cimentos resinosos (Nexus 2 e Variolink II) foram menos citotóxicos que os cimentos autoadesivos, bem como a presa dual minimizou os efeitos tóxicos dos cimentos avaliados.

Ulker, Sengun⁵¹ (2009) realizaram um estudo avaliando o efeito de cimentos resinosos autoadesivos. Neste estudo, foram utilizados os cimentos Rely X Unicem Clicker (3M/ESPE), MaxCem (Kerr), Panavia F 2.0 (Kuraray), BisCem (Bisco) e Bistite II DC (Tokuyama). Foi empregada uma câmara de perfusão, disponível comercialmente (Minucells & Minutissue GmbH, Bad Abbach, Germany). Essas câmaras possuíam dois compartimentos, um cavitário e outro pulpar, divididos pela interposição de um disco de dentina bovino com 500 µm de espessura. Uma cultura 3D de células derivadas da papila dental bovina foi previamente desenvolvida, cultivada e posteriormente transferida para o compartimento pulpar da câmara de perfusão. Os materiais foram manipulados de acordo com as orientações dos fabricantes e colocados diretamente sobre o disco de dentina, onde foram polimerizados. Uma silicona de moldagem foi utilizada como controle negativo. A

câmara foi então perfundida com meio de cultura (2 mL/hora) por 24 hs, sendo posteriormente realizada a análise de viabilidade celular (teste de MTT). Os resultados deste estudo demonstraram que, com exceção do cimento MaxCem, os demais cimentos avaliados reduziram significativamente a viabilidade das células em cultura. Os cimentos estudados apresentaram o seguinte padrão decrescente de intensidade da citotoxicidade: Biscem > Panavia F 2.0 > Rely X Unicem Clicker > Bistite II DC (menos citotóxico). Desta forma, concluiu-se que os cimentos resinosos podem exercer efeito citopático sobre células quando aplicados em cavidades com delgada espessura de remanescente dentinário.

Ergun et al¹³ (2011) avaliaram os efeitos da redução do tempo de polimerização de cimentos resinosos sobre a viabilidade de células L929. Neste estudo, foram utilizados cimentos resinosos de presa dual: Rely X Unicem, Duolink, Lute-It, Ilusion e Rely X ARC, os quais foram manipulados e inseridos em matrizes circulares com dimensões padronizadas (6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura). Um disco de cerâmica (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foi interposto entre o cimento e a fonte de luz simulando a condição clínica de cimentação de uma prótese fixa livre de metal. A fotopolimerização foi realizada utilizando um fotopolimerizador de luz LED de alta potência, sendo que 20 amostras foram fotopolimerizadas por 20 segundos (redução de 50% no tempo de polimerização recomendado pelo fabricante) e as outras 20 amostras foram fotopolimerizadas por 40 segundos (como recomendado pelo fabricante). As amostras foram imersas em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino e incubadas sob agitação por 24 hs para a obtenção dos extratos. Após este período, os extratos foram filtrados e colocados sobre as células L929 por 24 hs, quando então foi realizado o teste de MTT. Os resultados deste estudo mostram que os extratos de amostras com redução em 50% do tempo de exposição à fonte de luz foram mais citotóxicas quando comparado às amostras do mesmo material fotopolimerizadas por 40 segundos, com exceção do Rely X Unicem e do Ilusion. Os autores concluíram que a redução do tempo de polimerização dos cimentos resinosos Rely X ARC, Duolink e Lute-It acarretou em maior efeito citotóxico destes cimentos sobre as células L929.

Ainda no ano de 2011, Sahabi et al.⁴³ avaliaram a citotoxicidade de um cimento resinoso (Panavia F2), de um CIVMR (Rely X Plus) e de um cimento de fosfato de zinco (Harvard) sobre células L929 em cultura. Os materiais experimentais

foram manipulados conforme as instruções dos fabricantes e inseridos em matrizes circulares de dimensões padronizadas (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura). Foram utilizados como controles positivo e negativo uma solução de hipoclorito de sódio e lâminas de vidro, respectivamente. As células foram previamente cultivadas em placas de 6 wells. As amostras foram colocadas nos wells de tal maneira que não entrassem em contato com as células em cultura. Foi avaliada a viabilidade celular (teste de MTT) após 1 hora, 24 hs ou 1 semana. A partir da metodologia empregada, os autores observaram que o cimento de fosfato de zinco foi o que mais reduziu a viabilidade celular em todos os períodos avaliados. A citotoxicidade do cimento resinoso diminuiu com o decorrer do tempo, enquanto que a citotoxicidade do CIVMR aumentou, equiparando-se ao cimento de fosfato de zinco no período de avaliação de 1 semana. Portanto, os autores concluíram que o cimento resinoso foi o menos citotóxico para as células L929, sendo que com o decorrer do tempo o CIVMR pode aumentar seu efeito citopático.

2.3.2 Estudos in vivo - Biocompatibilidade de Cimentos com Base Resinosa

Souza et al.⁴⁷ (2006) realizaram um estudo, o qual foi dividido em dois experimentos. No primeiro foi realizada a avaliação da citotoxicidade de CIVMRs sobre células MDPC-23, sendo que no segundo experimento os autores avaliaram a biocompatibilidade in vivo destes cimentos. Neste último experimento in vivo, tubos de polietileno com dimensões padronizadas (10 mm comprimento e 1,5 mm de espessura) foram preenchidos com os materiais (Vitremmer, Vitrebond e Rely X Luting). Esses tubos foram implantados no subcutâneo do dorso de ratos, num total de 18 amostras por grupo. O sacrifício dos animais foi realizado nos períodos de 7, 30 ou 90 dias após as implantações. As biópsias foram submetidas ao processamento histológico e analisadas com base em scores quanto à: 1) reação inflamatória - (0) ausente, (1) suave, (2) moderada e (3) severa; 2) formação de cápsula de fibrosa ao redor dos implantes - delgada ou espessa; e 3) presença de macrófagos e células gigantes - (0) ausente, (1) leve e (2) moderada. Os resultados, para o período de 7 dias, mostraram que houve reação inflamatória moderada, com formação de cápsula fibrosa espessa e leve infiltração de macrófagos e células gigantes em todos os grupos experimentais. Para o período de 30 dias, a reação

inflamatória foi de leve a moderada, a cápsula fibrosa bem como a presença de células inflamatórias reduziu em parte das amostras. No período final de 90 dias, apenas uma amostra do Rely X Luting e outra do Vitrebond apresentaram reação inflamatória moderada, cápsula fibrosa delgada ao redor dos implantes e sem a presença de macrófagos ou células gigantes. Desta forma, o estudo considerou os CIVMRs avaliados como biocompatíveis com o tecido subcutâneo de ratos.

De Souza Costa et al.¹¹, em 2006, avaliaram a resposta pulpar de dentes submetidos à cimentação de inlays com um cimento resinoso autoadesivo Rely X Unicem (3M/ESPE) ou um cimento resinoso convencional Variolink® II (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Para este estudo, foram selecionados 34 pré-molares hígidos de pacientes jovens, cuja média de idade foi de 14 anos. Na superfície vestibular destes dentes, cavidades de classe V com 2,5 mm de profundidade foram cuidadosamente confeccionadas. Após o preparo, as cavidades foram moldadas com Imprint II (3M/ESPE) e vazadas em gesso. Uma inlay foi preparada no modelo de gesso utilizando a resina composta Z250 (3M/ESPE) pela técnica incremental e cimentadas de acordo com os grupos: G1 - Rely X Unicem; G2 - Variolink® II; G3 - cimento de hidróxido de cálcio (Dycal® - Dentsply Caulk, Milford, DE, US). A cimentação com Variolink® II foi realizada após condicionamento ácido da cavidade com ácido fosfórico 37% e aplicação de sistema adesivo Excite DSC, tal como recomendado pelo fabricante. Os dentes foram extraídos em 7 ou 60 dias e submetidos ao processamento histológico. Os autores estabeleceram critérios para a classificação quanto à resposta inflamatória, desorganização tecidual, formação de dentina reacional e presença de bactérias. Os resultados deste estudo, no período de 7 dias, para o Rely X Unicem, mostraram que dois dentes exibiam ruptura da camada odontoblástica associada à resposta inflamatória leve, sem a presença de dentina reacional ou bactérias. Para o mesmo material, em 60 dias, apenas um dente apresentou células inflamatórias na polpa, sendo que este fato parecia estar associado à delgada espessura de dentina remanescente. Para o Variolink® II, no período de 7 dias, os resultados mostraram reação inflamatória moderada e desorganização tecidual em duas amostras. No assoalho da cavidade destes dentes, houve formação de longos tags de resina no interior dos túbulos dentinários. Em outros três dentes ocorreu reação inflamatória leve acompanhada de discreta desorganização tecidual. Para o período de 60 dias, em um dente, cujo

remanescente dentinário era delgado (225 μm), houve reação inflamatória crônica moderada associada à perda parcial da camada de pré-dentina. Observou-se também reabsorção dentinária em alguns pontos, formação de longos tags e difusão de glóbulos de resina pelo interior dos túbulos dentinários. Nos demais dentes, a reação inflamatória era discreta. Assim, concluiu-se que o cimento resinoso convencional (Variolink® II) pode causar danos mais severos ao complexo dentino-pulpar que o cimento resinoso autoadesivo (Rely X Unicem).

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a citotoxicidade direta de componentes liberados de cimentos resinosos quando aplicados sobre uma cultura primária de células pulpares humanas (HDPCs) e células odontoblastóides MDPC-23, por meio de protocolos laboratoriais que permitem determinar o metabolismo, tipo de morte e morfologia celular.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cultura de células MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente de penicilina e estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO) em uma atmosfera umedecida à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. As células foram subcultivadas a cada três dias na densidade de 3 x 10⁴ células/cm².

4.2 Obtenção da cultura primária HDPCs

Terceiros molares inclusos ou semi-inclusos recém-extraídos foram obtidos de pacientes voluntários com faixa etária de 15 a 30 anos, os quais foram atendidos na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP. Para participação na pesquisa, os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP (Processo: 296.630) (Anexo). Dentes com cárie, doença periodontal ou alterações endodônticas foram excluídos do estudo. Após extração, os dentes foram acondicionados em tubos Falcon (TPP - Techno Plastic Products AG, Alemanha) contendo solução salina tamponada (PBS) suplementada com antibiótico e antifúngico (GIBCO, 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina, e 0,25 µg/mL Fungizone) por até 15 minutos. Para a obtenção do tecido pulpar, uma canaleta horizontal de 1 mm foi confeccionada abaixo da junção amelo-dentinária, utilizando uma ponta diamantada (nº 4103 KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montada em motor de alta rotação (modelo MRS 400 Torque - Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) e sob constante refrigeração. Em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, SP, Brasil), a porção coronária do dente foi separada da radicular, permitindo a remoção mecânica do tecido pulpar por meio do uso de limas endodônticas (Tipo K, Dentsply, Maillefer,

Suiça). O tecido foi fragmentado com lâmina de bisturi esterilizada nº 15 (Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co. Ltd., Suzhou, China), sendo que os fragmentos foram transferidos para garrafas de cultura de 25 cm² (Corning Inc., Corning, NY, USA) contendo meio de cultura DMEM (GIBCO) suplementado com 10% de SFB, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mmol/L de glutamina (GIBCO) e 200 units/mL de colagenase Tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Estas garrafas foram colocadas e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ durante 24hs. Em seguida, as células foram centrifugadas e subcultivadas em garrafas de cultura celular com meio de cultura DMEM suplementado sem adição de colagenase. Células pulparens entre a 3^a e 8^a passagens foram usadas no estudo.

As células da cultura primária foram caracterizadas quanto à presença de células tronco nas passagens 6^a e 9^a. Cada passagem foi analisada em dois experimentos independentes, em equipamento In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) para registro das imagens através da marcação da fluorescência de células pelos marcadores de células tronco: CD 146, Nanog, OCT 34, STRO 1 e CD 44. A caracterização celular demonstrou a presença de células tronco nas duas passagens analisadas.

4.3 Obtenção dos corpos de prova e grupos experimentais

Os materiais avaliados neste estudo, bem como a composição química deles, estão apresentados na Tabela 1.

Os materiais foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante, inseridos em matrizes metálicas (Figuras 1 e 2) com dimensões padronizadas (14 mm de diâmetro e 1 mm de altura), entre dois filmes plásticos e duas lâminas de vidro (Figuras 3 e 4) para prevenir a formação da camada superficial inibida por oxigênio²⁵. Os corpos de prova do cimento Rely X Luting 2 foram submetidos à presa química por 10 minutos, enquanto que os corpos de prova dos cimentos Rely X U200 e Rely X ARC foram fotopolimerizados por 20 e 40 segundos, respectivamente. A intensidade de luz (450 mW/cm²) foi monitorada por meio de um radiômetro acoplado ao fotopolimerizador. Em seguida os corpos de prova foram esterilizados por radiação UV por 20 minutos em cada face.

Tabela 1- Composição química dos materiais a serem avaliados neste estudo.

Products	Composition	CAS Number	% by Wt
Rely X Luting 2	Paste A		
	HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate)	868-77-9	5 - 15%
	Water	7732-18-5	10 - 20%
	4-(dimethylamino)-benzeneethanol	50438-75-0	< 1%
	Silane treated filler	None	70 - 80%
	Silane treated silica	68909-20-6	1 - 5%
	Paste B		
	Bis-GMA (bisphenol a diglycidyl ether dimethacrylate)	1565-94-2	1-5%
	HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate)	868-77-9	10-20%
	Water	7732-18-5	5-15%
	Potassium persulfate	7727-21-1	1-5%
	Copolymer of acrylic and itaconic acids	25948-33-8	30-40%
	Silane treated ceramic	444758-98-9	30-40%
Potassium diphosphate	7778-77-0	1-5%	
Rely X U200	Base Paste		
	Silane treated glass powder	None	45-55%
	2-propenoic acid, 2-methyl-, 1,1'-[1-(hydroxymethyl)-1,2-ethanediyl] ester, reaction products with 2-hydroxy-1,3-propanediyl dimethacrylate and phosphorus oxide	1224866-76-5	20 - 30%
	TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate)	109-16-0	10-20%
	Silane treated silica	68909-20-6	10-20%
	Sodium persulfate	7775-27-1	< 3%
	Glass powder	65997-17-3	< 3%
	Tert-butyl peroxy-3,5,5-trimethylhexanoate	13122-18-4	< 0.5%
	Catalyst		
	Silane treated glass powder	None	55-65%
	Substituted dimethacrylate	27689-12-9	20-30%
	Silane treated silica	68909-20-6	< 5%
	Sodium p-toluenesulfinate	824-79-3	< 5%
	1-benzyl-5-phenyl-barbic-acid	None	< 5%
	Calcium salt	None	< 5%
	1,12-dodecane dimethacrylate	72829-09-5	< 5%
Calcium hydroxide	1305-62-0	< 2%	
Rely X ARC	Paste A		
	Silane treated ceramic	444758-98-9	60-70%
	TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate)	109-16-0	10-20%
	Bis-GMA (bisphenol a diglycidyl ether dimethacrylate)	1565-94-2	10-20%
	Silane treated silica	248596-91-0	1-10%
	Functionalized dimethacrylate polymer	None	1-10%
	Triphenylantimony	603-36-1	< 0.2%
	Paste B		
	Silane treated ceramic	444758-98-9	55-65%
	TEGDMA (triethylene glycol dimethacrylate)	109-16-0	10-20%
	Bis-GMA (bisphenol a diglycidyl ether dimethacrylate)	1565-94-2	10-20%
	Silane treated silica	248596-91-0	1-10%
	Functionalized dimethacrylate polymer	None	1-10%
2-benzotriazolyl-4-methylphenol	2440-22-4	< 1%	
benzoyl peroxide	94-36-0	< 1%	

Figura 1- Matriz metálica com diâmetro e espessura padronizados.



Figura 2- Inserção do cimento na matriz metálica.



Figura 3- Matriz entre dois filmes plásticos e duas lâminas de vidro, mantidas sob a pressão digital durante a polimerização.

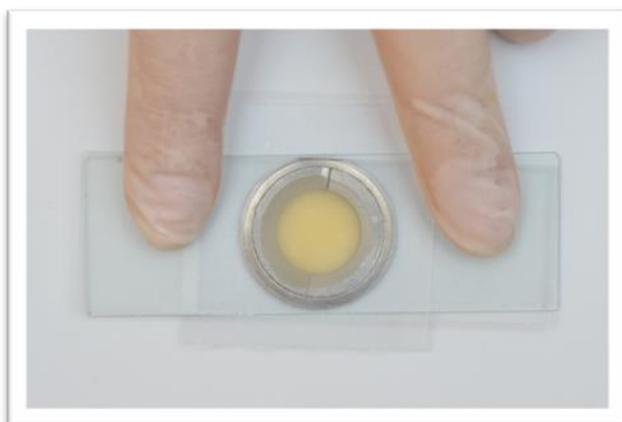


Figura 4- Corpo de prova preparado.



4.4 Obtenção dos extratos

Cada corpo de prova foi posicionado, individualmente, em um compartimento de placa de acrílico esterilizada de 24 wells contendo 1 mL de DMEM sem SFB. O grupo controle constituiu apenas de meio de cultura. Os corpos de prova ficaram imersos pelo período de 24hs em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, obtendo-se os extratos (meio de cultura contendo componentes liberados dos cimentos). Estes extratos foram aplicados sobre as células MDPC-23 ou HDPCs

previamente cultivadas, resultando nos grupos: G1 - controle (DMEM); G2 - Rely X Luting 2; G3 - Rely X U200; e G4 - Rely X ARC.

4.5 Procedimento experimental

Para a avaliação da viabilidade celular e morfologia das células expostas ou não aos extratos, as culturas celulares foram semeadas, separadamente, em placas de 24 compartimentos (4×10^4 células/well), sendo incubadas a 37°C e 5% de CO_2 durante o período de 48hs. Então, uma alíquota de 400 μL do extrato de cada material em teste foi aplicada por 24hs sobre as células em cultura.

Para a avaliação do tipo de morte celular, as células foram semeadas em placas de 96 compartimentos (6.700 células/well). Após 48hs de incubação à 37°C e 5% de CO_2 , uma alíquota de 40 μL do extrato obtido de cada material em teste foi aplicada sobre as células pelo período de 24hs.

4.6 Avaliação da viabilidade celular (Teste de MTT)

A análise da viabilidade celular ($n=6$) foi realizada pelo teste de MTT, o qual é caracterizado pela demonstração citoquímica da enzima desidrogenase succínica, que representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Após o tratamento das células com os extratos, o mesmo foi aspirado e uma solução contendo 900 μL de meio de cultura DMEM e 100 μL de solução de MTT (Sigma), na concentração de 5 mg/mL de PBS, foi aplicada em cada compartimento com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As células imersas nesta solução foram incubadas por mais 4hs a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, o meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e substituído por 600 μL de solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N para solubilizar os cristais formados pela degradação dos anéis de tetrazolium. Em seguida, três alíquotas de 100 μL foram transferidas para placas de 96 compartimentos. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader – Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Para ambas as linhagens celulares (MDPC-23 e HDPC), os valores de absorbância referentes à viabilidade celular após contato com os diferentes

materiais investigados foram transformados em porcentagem do controle. Células expostas apenas ao DMEM (controle) representam 100% de viabilidade celular.

Os dados de porcentagem de viabilidade celular foram então submetidos aos testes estatísticos de Kruskal-Wallis complementado por Mann-Whitney para a comparação dos grupos aos pares. Todos os testes foram considerados ao nível de significância de 5%.

4.7 Análise da morfologia celular (MEV) e caracterização de partículas em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A morfologia celular foi analisada em microscópio eletrônico de varredura MEV (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, Tóquio, Japão). Após aspiração dos extratos aplicados por 24hs sobre as células, estas foram lavadas com PBS, fixadas por 1h em glutaraldeído a 2,5% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio. Em seguida, as células foram desidratadas através de trocas ascendentes de soluções de etanol (30%, 50%, 70%, 95% e 100%) e lavadas com solvente de baixa tensão superficial 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, New Jersey, USA). As lamínulas com as células aderidas à sua superfície foram fixadas em stubs metálicos, permanecendo em dessecador pelo período de 24hs. Então, os espécimes foram metalizados com ouro e finalmente levados ao MEV para análise detalhada da morfologia celular^{34, 47}.

Partículas sólidas sobre as amostras de MEV, quando presentes, foram caracterizadas quanto aos elementos químicos constituintes em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS). A análise em EDS permite a identificação dos elementos químicos presentes a partir da emissão de energia sobre a amostra. Os elétrons da camada de valência dos átomos presentes absorvem a energia (estado excitado) e mudam para um nível energético superior. Ao retornarem ao estado fundamental liberam a energia adquirida anteriormente em forma de radiação X. Como a quantidade de energia necessária para excitar um elétron é única para cada elemento, é possível determinar quais os elementos químicos estão presentes na amostra.

4.8 Análise do tipo de morte celular

A análise do tipo de morte celular (n=4) foi realizada pelo teste com kit Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) (Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit, V13241, Invitrogen, Paisley, UK). Para isto, após o período de 24hs de contato das células com o extrato, este foi aspirado e uma solução de Anexina V e PI em tampão (diluição 5:1:100) foi aplicada sobre as células por 15min. Então, a solução foi aspirada e os núcleos marcados com a solução de Hoechst (diluição 1:5000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 15 minutos. Após este período, as células foram levadas ao equipamento IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) para registro das imagens através da marcação da fluorescência de células viáveis (DAPI), necróticas (FITC) ou apoptóticas (Texas Red). Nove campos por amostra foram utilizados para obtenção dos dados quantitativos (IN Cell Investigator Software v1.6) relativos a porcentagem de marcação das células. Os dados de porcentagem de células viáveis, necróticas ou apoptóticas foram submetidos aos testes estatísticos de Kruskal-Wallis complementado por de Mann-Whitney. Todos os testes foram considerados ao nível de significância de 5%.

4.9 Análise Química dos extratos (HPLC)

Com o objetivo de determinar a liberação de HEMA, TEGDMA, Bis-GMA, Persulfato de Sódio e Peróxido de Benzoíla dos corpos de prova preparados com os cimentos resinosos, a análise química dos extratos (n=5) foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). Para este método de análise, foi empregado o equipamento de CLAE (Shimadzu®, Kioto, Japão), composto de uma bomba LC-20AT operando a uma vazão de 1 mL min⁻¹, degaseificador DGU-20A₅, injetor com amostrador de 50 µL SIL-10AF, detector de arranjo de diodo SPD-M20A (190 a 800 nm), controladora CBM-20A e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente (20 µL) e o programa empregado na aquisição dos dados foi o Software LC solution, SPD-M20A PDA *utility* (Shimadzu®). Utilizou-se a coluna cromatográfica Phenomenex® (Phenomenex, Torrance, CA, USA) Luna C8(2) (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm), no modo fase reversa e a coluna de

guarda Agilent® (12,5 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm). Como fase móvel, foi utilizado modo de eluição isocrático empregando acetonitrila:água (60:40 v/v) e ácido acético 0,1%. Para a obtenção de um padrão dos compostos químicos, HEMA e TEGDMA não foram diluídos; Bis-GMA foi diluído em Etanol (1mg/1ml), Peróxido de Benzoila foi diluído em Acetonitrila (1mg/1ml) e Persulfato de Sódio foi diluído em água (1mg/1ml). Os padrões foram analisados e definidos picos específicos: HEMA (em 3,4 minutos – absorção em 270 nm), TEGDMA (em 6,6 minutos – absorção em 260 nm), Bis-GMA (11,4 minutos – absorção em 276 nm), Persulfato de sódio (em 6,6 minutos – absorção em 220 nm).

4.10 Avaliação do pH dos extratos

Para a aferição do pH dos extratos, 3 mL de cada extrato (n=3) foram colocados em recipiente de vidro. Então, o valor do pH de cada extrato foi determinado antes e após sua aplicação sobre as células em cultura, utilizando-se para isto um pHmetro digital (PG 2000 - Gehaka, São Paulo, SP, Brasil).

Resultado

5 RESULTADO

5.1 Avaliação da viabilidade celular (Teste de MTT)

Os resultados de viabilidade celular estão apresentados na Tabela 2. Em geral, as células MDPC-23 foram mais sensíveis aos extratos que as HDPCs. O cimento Rely X Luting 2 causou, para as células MDPC-23 e HDPCs, redução de 95,8% e 89,4% na viabilidade, respectivamente. Para as células MDPC-23, houve diferença significativa entre o grupo controle (G1) e os grupos Rely X Luting 2 (G2) e Rely X U200 (G3) ($p < 0.05$). Para as HDPCs, observou-se diferença apenas entre G1 e G2 ($p < 0.05$).

Tabela 2 - Viabilidade (%) das células MDPC-23 e HDPCs após contato com os extratos obtidos dos diferentes cimentos resinosos.

Cimentos	Linhagem celular*	
	MDPC-23	HDPCs
Controle (DMEM)	101,5 (96,3-104,5) ^a	98,4 (93,7-103,4) ^A
Rely X Luting 2	5,7 (3,9-6,4) ^c	9,0 (5,4-19,4) ^B
Rely X U200	70,0 (60,2-78,6) ^b	109,7 (102,7-121,8) ^A
Rely X ARC	78,8 (72,1-88,6) ^{ab}	127,4 (119,8-142,7) ^A

Números representam mediana (percentile 25-percentil 75), n=6. ^aPara cada linhagem celular, grupos identificados pela mesma letra não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$). *Os tipos celulares não foram comparados entre si.

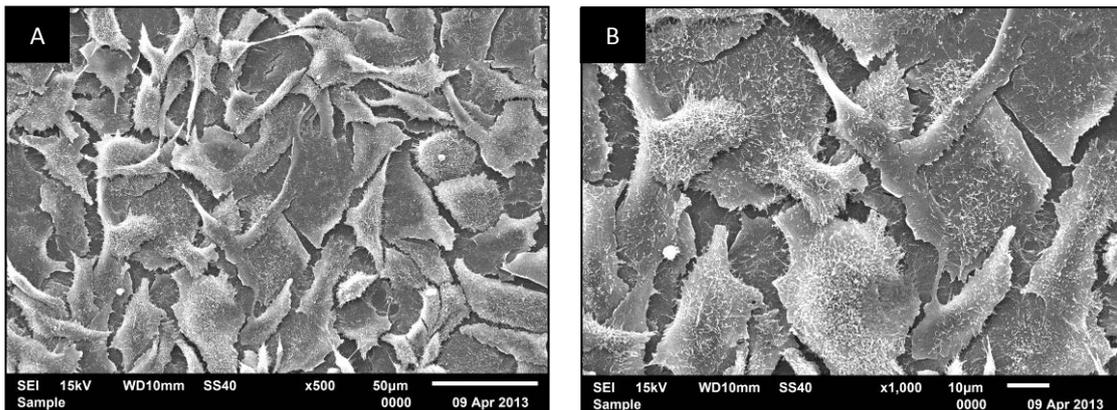
5.2 Análise da morfologia celular (MEV) e caracterização de partículas em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

5.2.1 Análise da morfologia das células MDPC-23 (MEV)

G1 – Controle (DMEM): Grande número de células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro foi observado. As células MDPC-23 exibem amplo citoplasma,

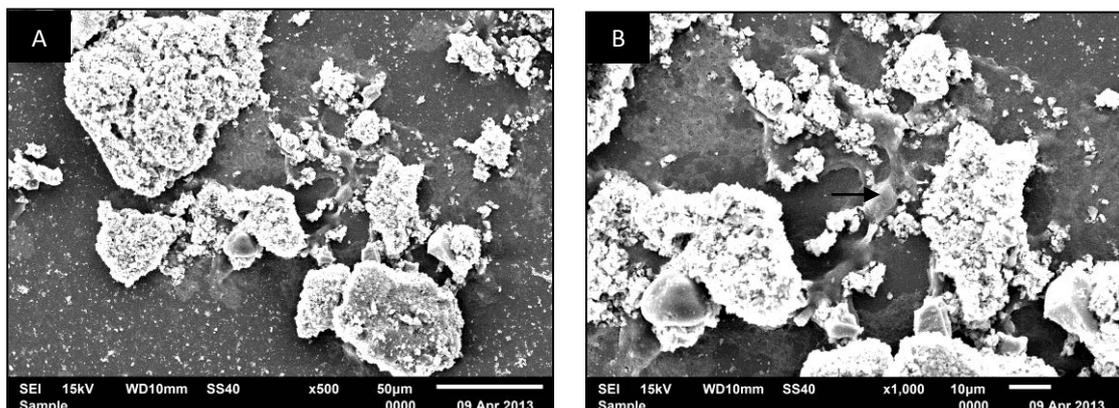
recobrando, praticamente, toda lamínula de vidro sobre a qual foram cultivadas (Figura 5 A/B).

Figura 5 A/B – MDPC-23. **A:** Fotomicrografia representativa do grupo G1 (controle). Um grande número de células está recobrando a lamínula de vidro. MEV, 500x. **B:** Detalhe da figura anterior. Note que as células MDPC-23 apresentam amplo citoplasma, do qual se originam numerosos prolongamentos finos e curtos que as mantêm aderidas ao substrato. MEV, 1.000x.



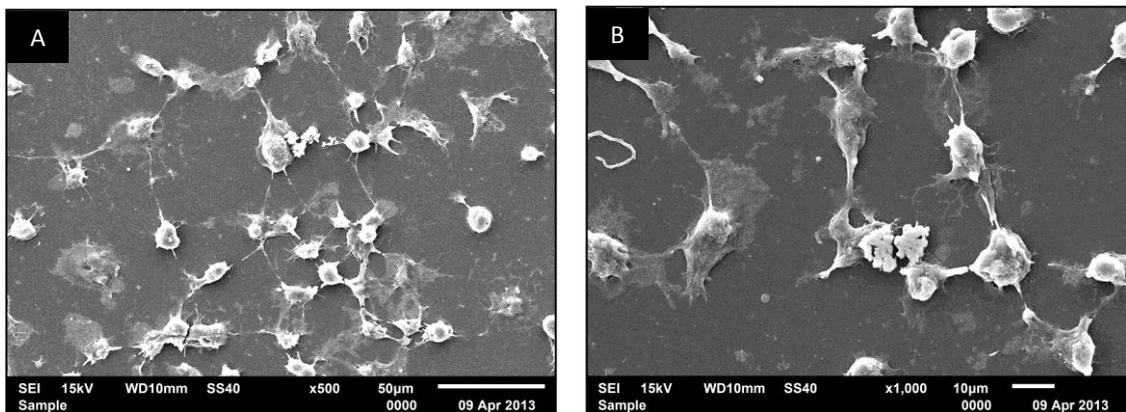
G2 – Rely X Luting 2: Resíduos de cimento estavam presentes junto a uma reduzida quantidade de células, as quais apresentavam contração do citoplasma com consequente redução de tamanho quando comparado a G1 (Figura 6 A/B).

Figura 6 A/B – MDPC-23. **A:** Fotomicrografia representativa do grupo G2 (Rely X Luting 2). Grande quantidade de resíduos do cimento pode ser observado sobre a lamínula de vidro, onde poucas células estão aderidas. MEV, 500x. **B:** Detalhe da figura anterior. Note que apenas um reduzido número de células (seta), localizado abaixo dos fragmentos liberados do cimento Rely X Luting 2, pode ser observado. Estas poucas células exibem notável redução de tamanho devido a contração do citoplasma. MEV, 1.000x.



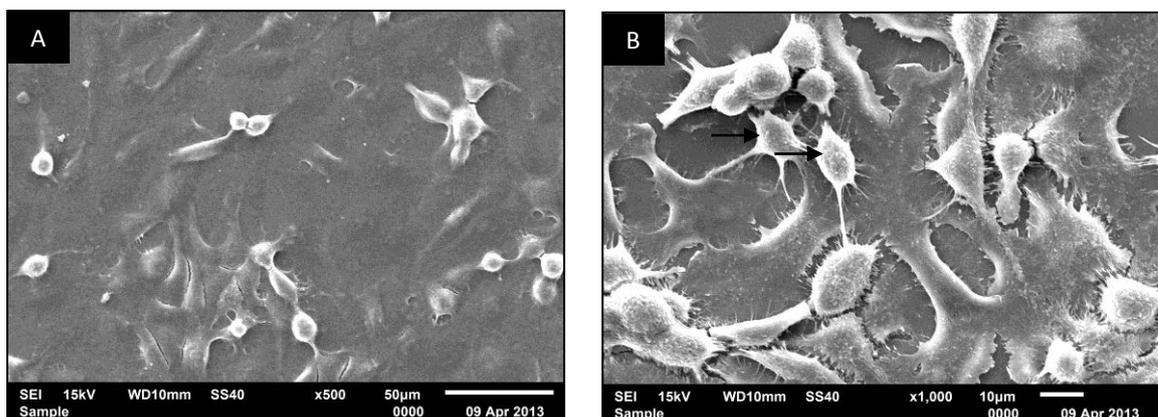
G3 – Rely X U200: Foi observado que apenas uma reduzida quantidade de células MDPC-23 permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Estas células exibiam notável alteração morfológica (Figura 7 A/B).

Figura 7 A/B – MDPC-23. **A:** Fotomicrografia representativa do grupo G3 (Rely X U200), onde as poucas células que permaneceram aderidas ao substrato exibem reduzido tamanho em decorrência da contração do citoplasma. MEV, 500x. **B:** Detalhe da figura anterior. Note a alteração morfológica das células quando comparadas à figura 5A/B. Um pequeno resíduo de material pode ser observado entre as células. MEV, 1.000x.



G4 – Rely X ARC: Um grande número de células MDPC-23 com amplo citoplasma permaneceu aderido o substrato de vidro. Estas células exibiam características morfológicas semelhantes ao grupo controle (Figura 8 A/B).

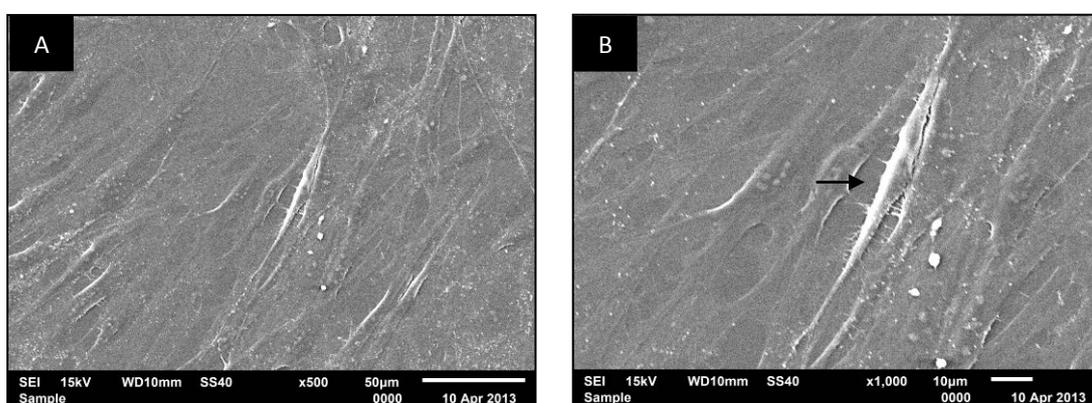
Figura 8 A/B – MDPC-23. **A:** Fotomicrografia representativa do grupo G4 (Rely X ARC). Note que um grande número de células permaneceu aderido ao substrato de vidro. MEV, 500x. **B:** Células com amplo citoplasma, do qual se originam numerosos prolongamentos finos e curtos, recobrem o substrato de vidro. Observe que apenas algumas poucas destas células apresentaram contração do citoplasma e consequentemente redução de tamanho (setas). MEV, 1.000x.



5.2.2 Análise da morfologia das HDPCs (MEV)

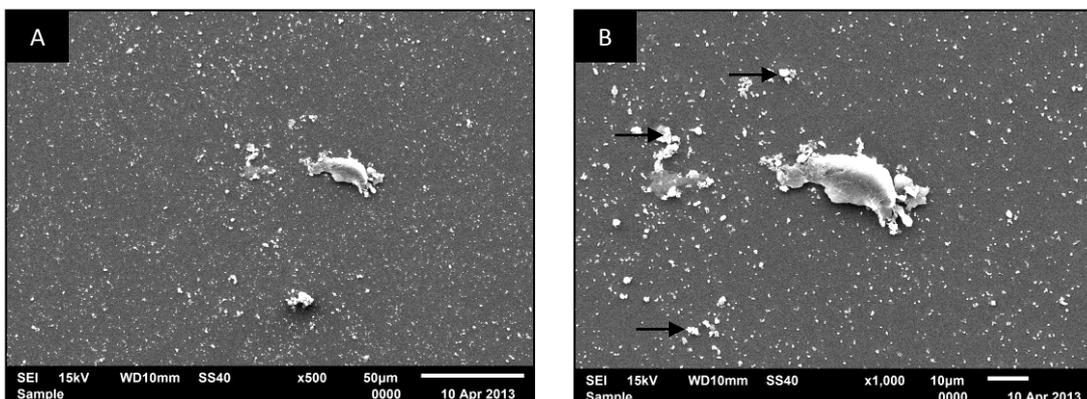
G1 – Controle (DMEM): Um grande número de células alongadas estava recobrendo a lamínula de vidro sobre a qual haviam sido cultivadas (Figura 9 A/B).

Figura 9 A/B – HDPCs. A: Fotomicrografia representativa do grupo G1 (Controle). Um grande número de células com morfologia alongada pode ser observado recobrendo o substrato de vidro. MEV, 500x. B: Detalhe da figura anterior. Note que apenas algumas pequenas áreas da lamínula de vidro podem ser observadas entre as HDPCs (seta horizontal). MEV, 1.000x.



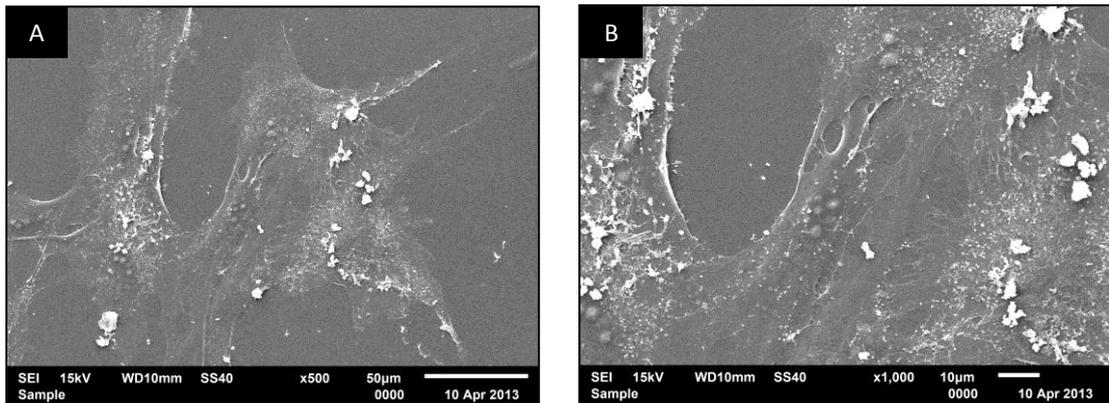
G2 – Rely X Luting 2: Praticamente todas as células se deslocaram do substrato de vidro, onde resíduos de cimento foram observados (Figura 10 A/B).

Figura 10 A/B – HDPCs. A: Fotomicrografia representativa do grupo G2 (Rely X Luting 2). Raras células com profundas alterações morfológicas permaneceram aderidas ao substrato de vidro. MEV, 500x. B: Detalhe da figura anterior. Extensas áreas do substrato de vidro expostas denotam o desprendimento de células letalmente agredidas pelos componentes do cimento. Note os resíduos de cimentos dispersos sobre o substrato de vidro (setas horizontais). MEV, 1.000x



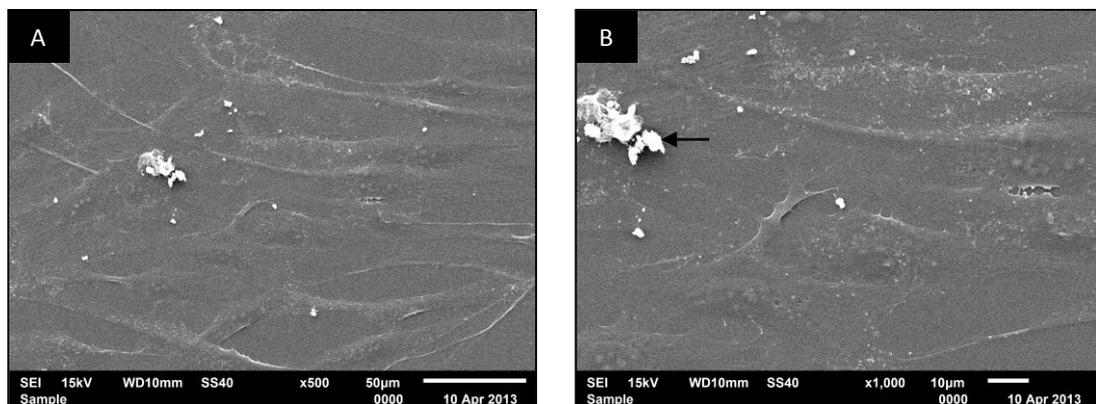
G3 – Rely X U200: Houve uma grande redução na quantidade de células sobre o substrato de vidro, sendo que a maioria delas exibiam alterações morfológicas (Figura 11 A/B).

Figura 11 A/B – HDPCs: A: Fotomicrografia representativa do grupo G3 (Rely X U200). Observe que as células sobre o substrato estão alongadas, porém distribuídas de forma desorganizada. MEV, 500x. B: MEV, 1.000x.



G4 – Rely X ARC: Numerosas células alongadas aderidas ao substrato de vidro apresentavam características morfológicas normais, semelhante ao observado em G1 (Figura 12 A/B).

Figura 12 A/B – HDPCs: A: Fotomicrografia representativa do grupo G4 (Rely X ARC). Células com morfologia alongada são observadas sobre o substrato de vidro. MEV, 500x. B: Detalhe da figura anterior. Note que uma pequena quantidade de resíduos de cimento está depositado sobre as células alongadas (seta). MEV, 1.000x.



5.2.3 Caracterização de partículas em Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A análise detalhada das amostras em MEV, associada à avaliação dos espécimes por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), demonstraram presença de partículas, tais como carbono (C), oxigênio (O), cálcio (Ca) e sílica (Si), sobre as amostras dos grupos G2, G3 e G4 para ambos os tipos celulares (Figuras 13 a 18).

Figura 13 - Fotomicrografia e gráfico representativos da análise em MEV/EDS das células MDPC-23 no grupo G2. Na fotomicrografia, pode-se observar a presença de resíduos do cimento (setas horizontais) sobre um reduzido número de células (setas obliquas), localizado abaixo dos fragmentos liberados do cimento Rely X Luting 2. MEV, 1.000x. Dentre os componentes do cimento em contato com as células, foi possível identificar a presença de O, Si, alumínio (Al), C, flúor (F) e sódio (Na).

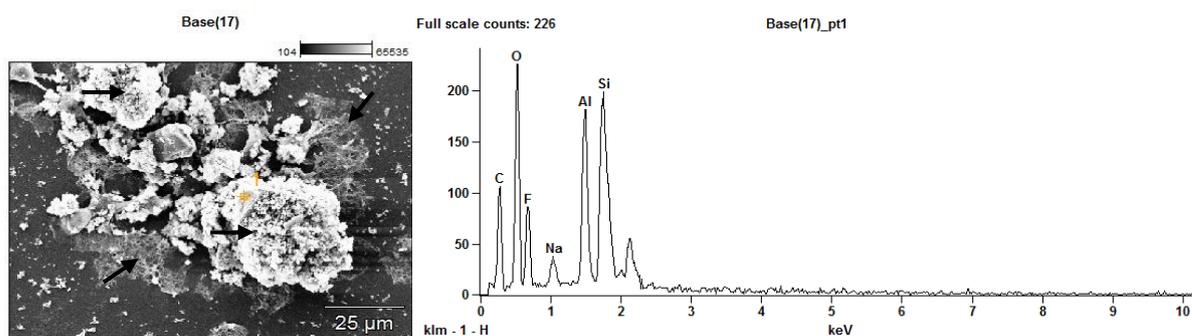


Figura 14 - Fotomicrografia e gráfico representativos da análise em MEV/EDS das células MDPC-23 no grupo G3. Note a alteração morfológica da célula, junto da qual estão presentes resíduos de cimento (setas horizontais). MEV, 5.000x. Dentre os componentes do cimento em contato com as células, foi possível identificar a presença de C, O, Ca, Na, Si e Nióbio (NB).

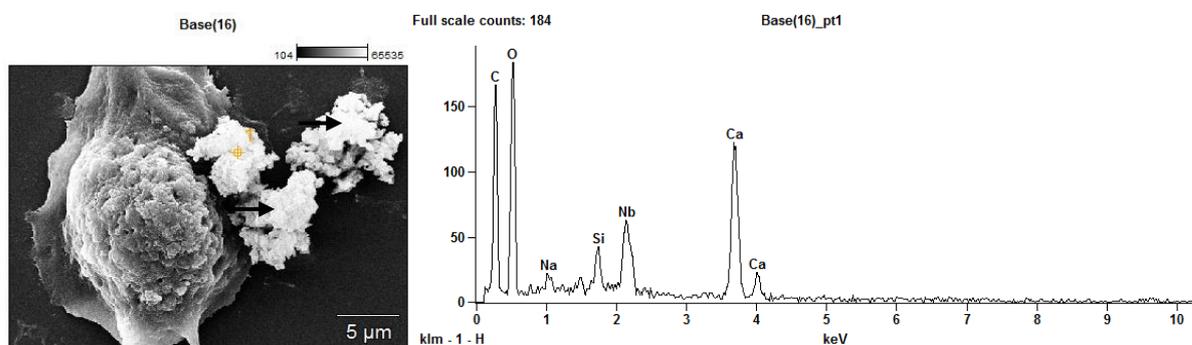


Figura 15 - Fotomicrografia e gráfico representativos da análise em MEV/EDS das células MDPC-23 no grupo G4. Células com amplo citoplasma recobrem o substrato de vidro. Note que pequenos resíduos de cimento (seta) estão depositados sobre as células. MEV, 2.500x. Dentre os componentes do cimento em contato com as células, foi possível identificar a presença de C, O, Si, Ca e Na.

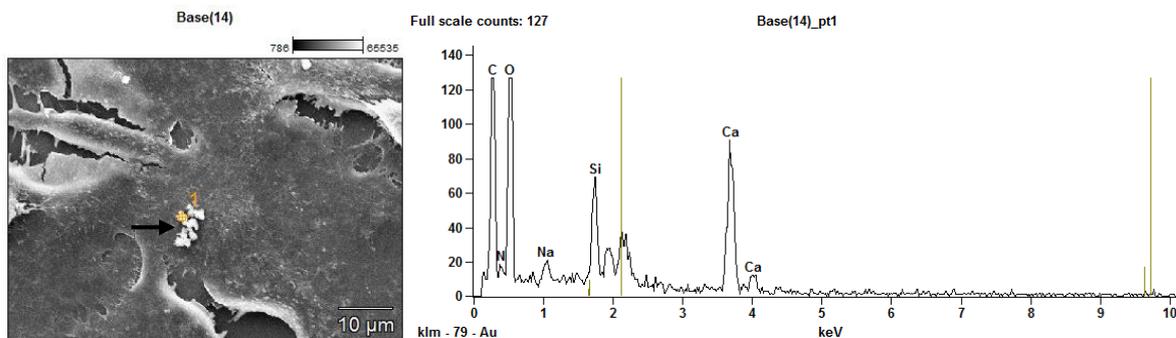


Figura 16 - Fotomicrografia e gráfico representativos da análise em MEV/EDS das HDPCs no grupo G2. Na fotomicrografia pode-se observar resíduos de cimento (setas) junto às células. MEV, 5.000x. Dentre os componentes do cimento em contato com as células, foi possível identificar a presença de O, Si, Berílio (Be), C, F, Na, Al e Potássio (K).

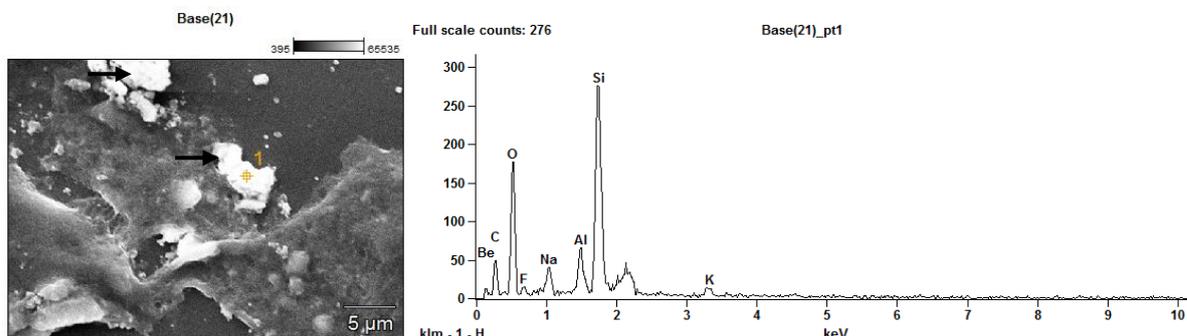


Figura 17 - Fotomicrografia e gráfico representativos da análise em MEV/EDS das HDPCs no grupo G3. Observe uma célula alongada, sobre a qual estão depositados resíduos de cimento (seta). MEV, 1.000x. Dentre os componentes do cimento em contato com as células, foi possível identificar a presença de C, O, Ca, Be, Na, Si e K.

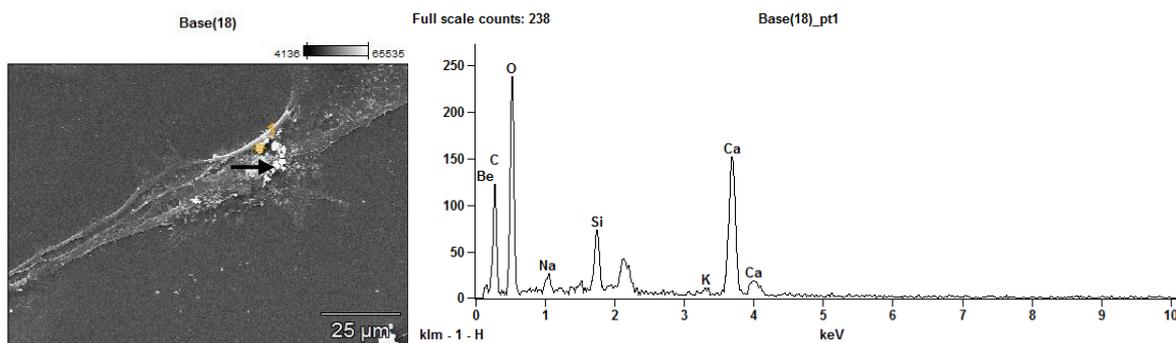
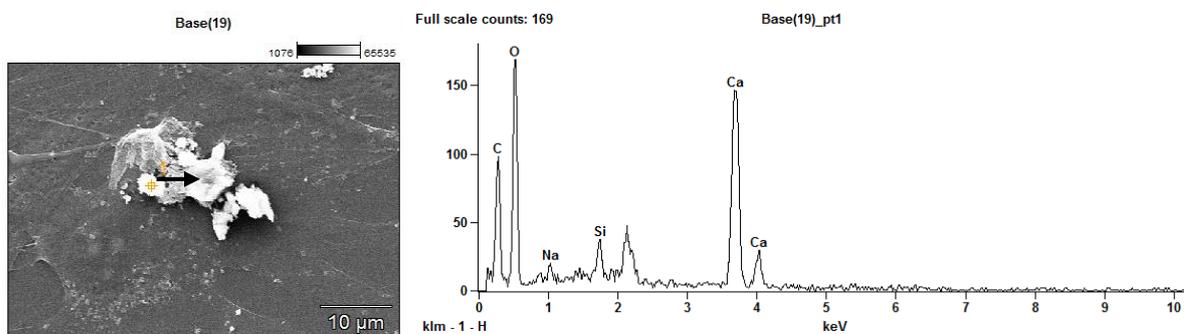


Figura 18 - Fotomicrografia e gráfico representativos da análise em MEV/EDS das HDPCs no grupo G4. Na fotomicrografia observa-se a presença de resíduos de cimento (seta) sobre as células aderidas ao substrato de vidro. MEV, 2.500x. Dentre os componentes do cimento em contato com as células, foi possível identificar a presença de C, O, Ca, Na e Si.



5.3 Análise do tipo de morte celular

Os dados do tipo de morte celular podem ser observados na Tabela 3, sendo que as imagens em fluorescência estão apresentadas nas Figuras 19 e 20.

Tabela 3 - Porcentagem de MDPC-23 e HDPC viáveis, mortas por necrose e mortas por apoptose após contato com extrato de diferentes materiais para cimentação.

Linhagem celular	Material	Células viáveis (%)	Tipo de morte celular	
			Necrose (%)	Apoptose (%)
MDPC-23	Controle	99,3 (99,2-99,5) ^{*a}	0,7 (0,5-0,8) ^a	0 (0-0,1) ^a
	Rely X Luting 2	0 (0-0,1) ^b	100,0 (99,9-100,0) ^b	n.d.
	Rely X U200	98,8 (98,3-99,1) ^a	0,9 (0,8-1,5) ^a	0,1 (0-0,3) ^a
	Rely X ARC	99,2 (99,1-99,4) ^a	0,8 (0,6-1,0) ^a	n.d.
HDPC	Controle	99,2 (98,9-99,5) ^A	0,8 (0,5-1,1) ^A	n.d.
	Rely X Luting 2	n.d.**	100,0 ^C	n.d.
	Rely X U200	92,0 (90,4-94,1) ^B	8,1 (5,9-9,6) ^B	n.d.
	Rely X ARC	99,0 (98,9-99,1) ^{AB}	1,0 (0,9-1,1) ^{AB}	0 (0-0,1)

*valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=4. **não detectado. ^a Para cada linhagem celular, medianas identificadas pela mesma letra representam grupos que não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05). Comparações são permitidas apenas nas colunas.

De maneira geral, foi possível demonstrar, estatisticamente, que não ocorreu morte celular por apoptose nas células avaliadas em todos os grupos experimentais. Além disso, foi observado 100% de morte celular por necrose em G2, tanto para as células MDPC-23 quanto para as HDPCs. Apenas 8,1% de morte celular por necrose ocorreu em G3 quando as HDPCs foram usadas.

Figura 19 – Fotomicrografias representativas da fluorescência das células MDPC-23 marcadas com Anexina, PI e Hoechst, após exposição das células ao DMEM ou extratos obtidos dos cimentos. **A-** G1 (Controle): Note que um grande número de células apresenta fluorescência dos núcleos marcados por Hoechst (azul). **B-** G2 (Rely X Luting 2): Note a fluorescência de poucos núcleos por Hoechst (azul) e a marcação evidente por PI (vermelho) denotando a morte celular por necrose. **C-** G3 (Rely X U200): Note a fluorescência de núcleos por Hoechst (azul) semelhante ao controle, porém espalhados de maneira não uniforme. **D-** G4 (Rely X ARC): Note a fluorescência de um grande número de núcleos marcados por Hoechst (azul).

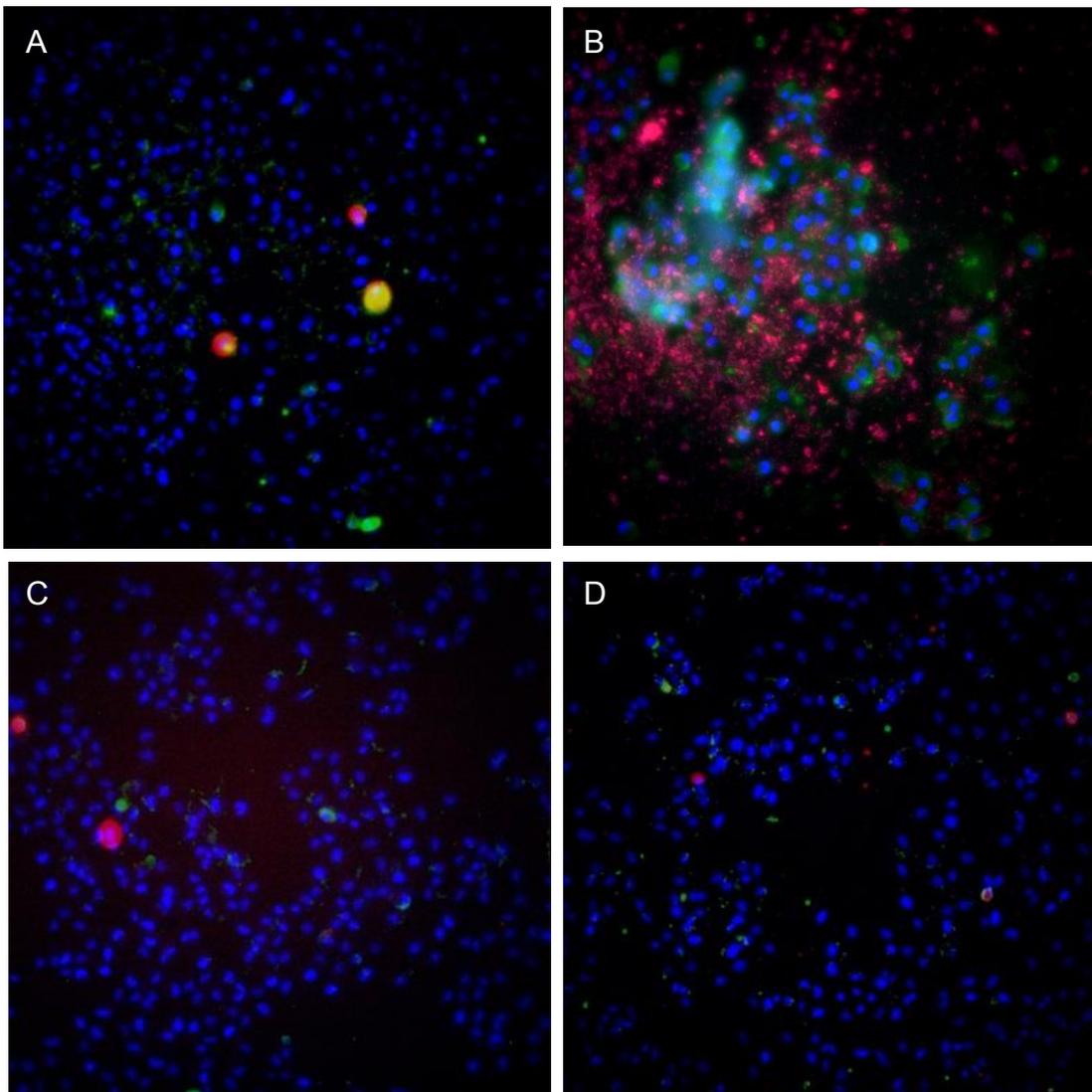
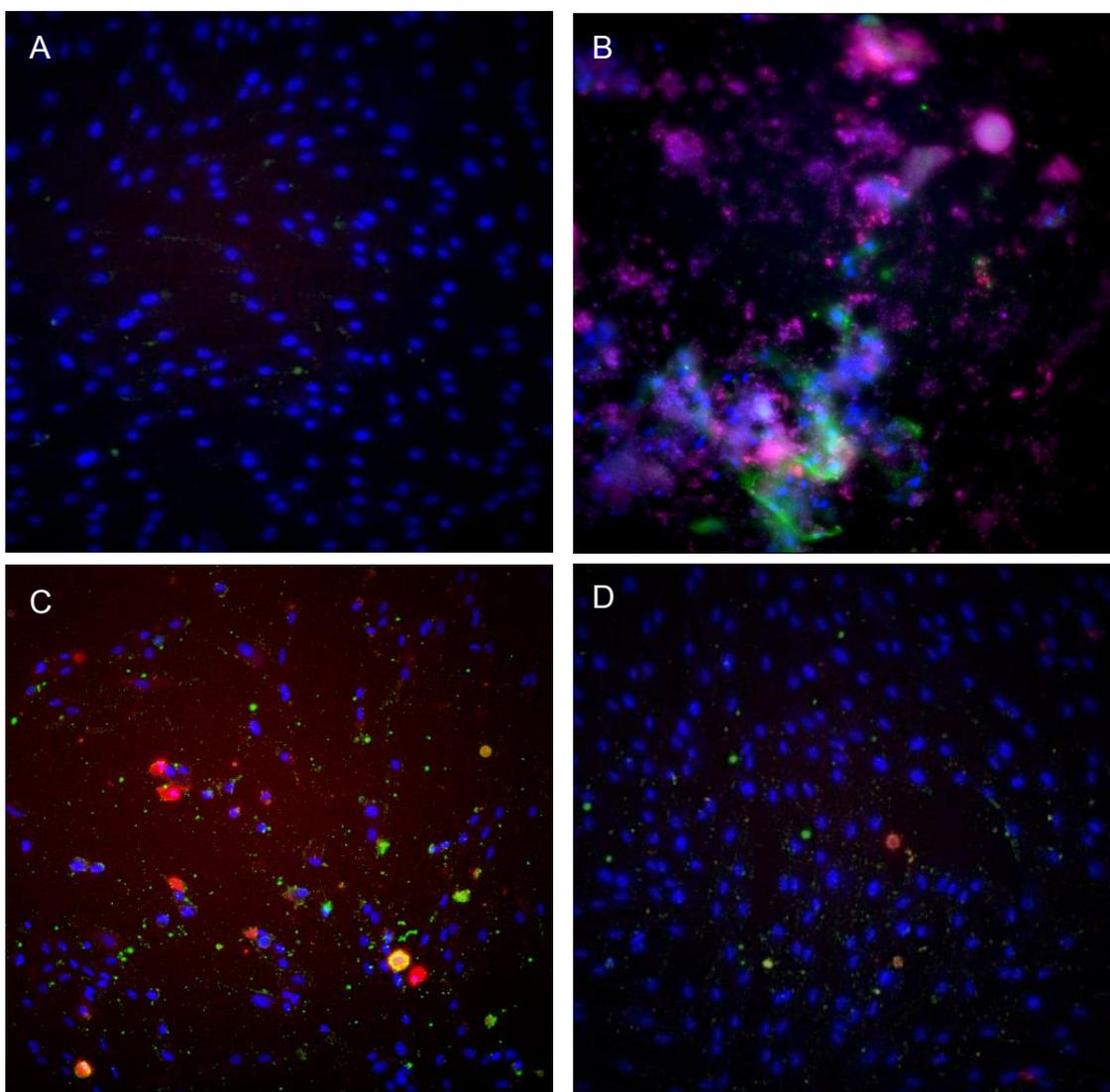


Figura 20 – Fotomicrografias representativas da fluorescência das HDPCs marcadas com Anexina, PI e Hoechst, após exposição das células ao DMEM ou extratos obtidos dos cimentos. **A**- G1 (Controle): Note a fluorescência do núcleo de numerosas células marcadas por Hoechst (azul). **B** – G2 (Rely X Luting 2): Note a fluorescência de poucos núcleos por Hoechst (azul) e a marcação evidente por PI (vermelho) denotando a ocorrência de intensa morte celular por necrose. **C** - G3 (Rely X U200): Note a fluorescência dos núcleos por Hoechst (azul), bem como a marcação de várias células por PI (vermelho), caracterizando que neste grupo também houve morte celular por necrose. **D** - G4 (Rely X ARC): Note a fluorescência dos núcleos por Hoechst (azul) e a marcação por PI (vermelho) de um menor número de células quando comparado a G2 e G3.



5.4 Análise Química dos extratos (HPLC)

Os dados obtidos em HPLC podem ser visualizados nas Figuras 21 a 25. De maneira geral, a análise química dos extratos demonstrou a discreta presença de TEGDMA nos grupos G3 e G4. Foi possível observar, ainda, a presença marcante de persulfato de sódio em todos os grupos, sendo mais intenso em G3.

Figura 21 - Cromatogramas sobrepostos dos extratos em relação ao padrão de HEMA. Pode-se observar a formação de um pico em 3,4 min (270 nm) com o padrão de HEMA. Note que não há formação de picos em 3,4 min (270 nm) quando foram analisados os extratos dos grupos G1, G2, G3 e G4.

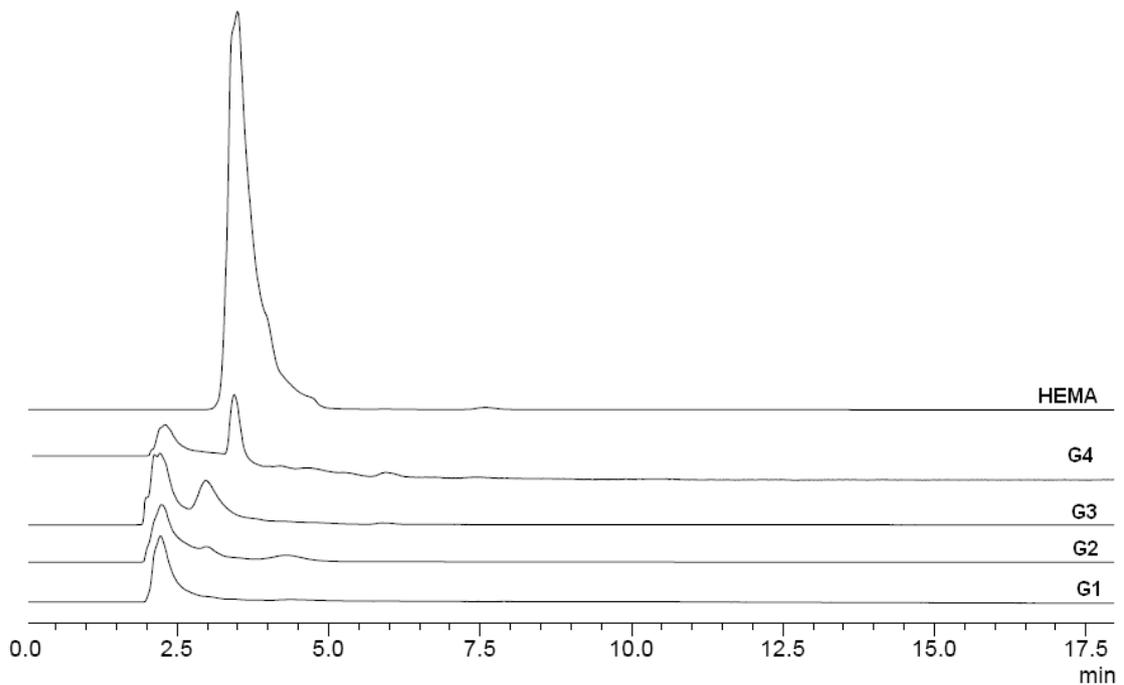


Figura 22 - Cromatogramas sobrepostos dos extratos em relação ao padrão de persulfato de sódio. Pode-se observar a formação de um pico em 6,6 min (220 nm) com o padrão de persulfato de sodio. Note que também há formação destes picos quando foram analisados os extratos dos grupos G1, G2, G3 e G4. Porém, em G3 este pico foi mais marcante que nos demais grupos, sugerindo que maior quantidade deste composto químico foi liberado do cimento Rely X U200.

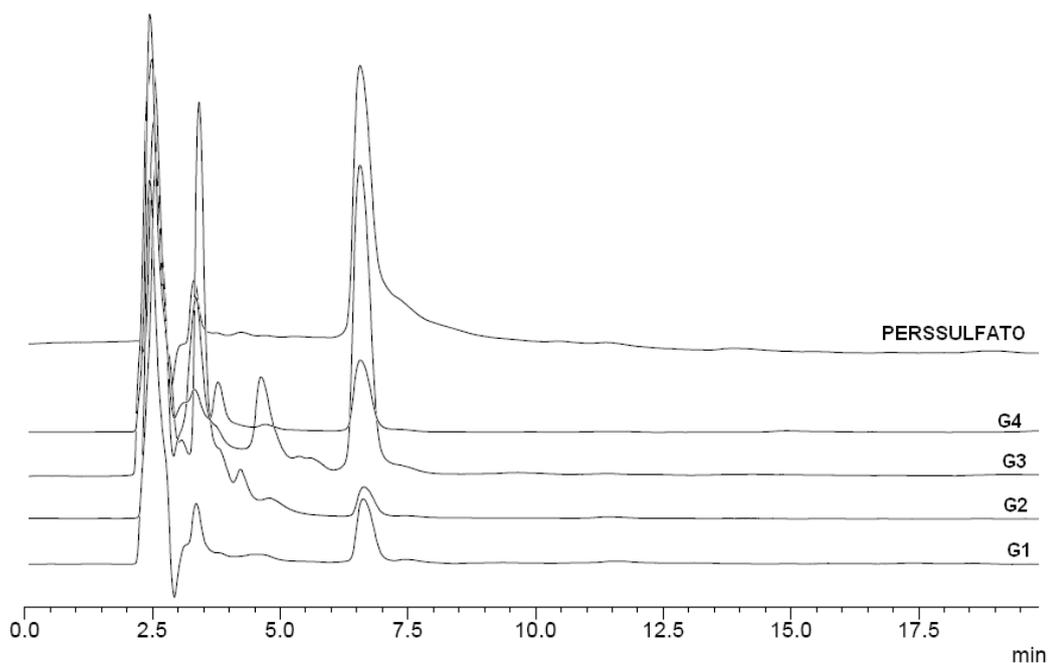


Figura 23 - Cromatogramas sobrepostos dos extratos em relação ao padrão de TEGDMA. Pode-se observar a formação de um pico em 6,6 min (260 nm) com o padrão de TEGDMA. Note que também há formação de picos discretos em 6,6 min (260 nm) quando foram analisados os extratos dos grupos G3 e G4.

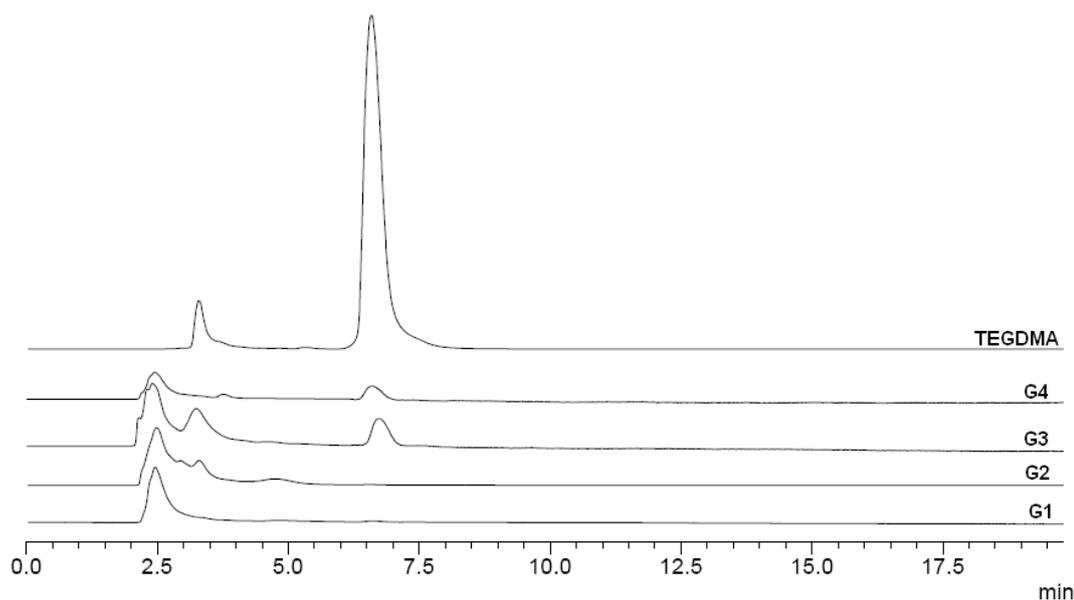


Figura 24 - Cromatogramas sobrepostos dos extratos em relação ao padrão de Bis-GMA. Pode-se observar a formação de um pico em 11,4 min (280 nm) com o padrão de Bis-GMA. Note que não há formação de picos em 11,4 min quando foram analisados os extratos dos grupos G1, G2, G3 e G4.

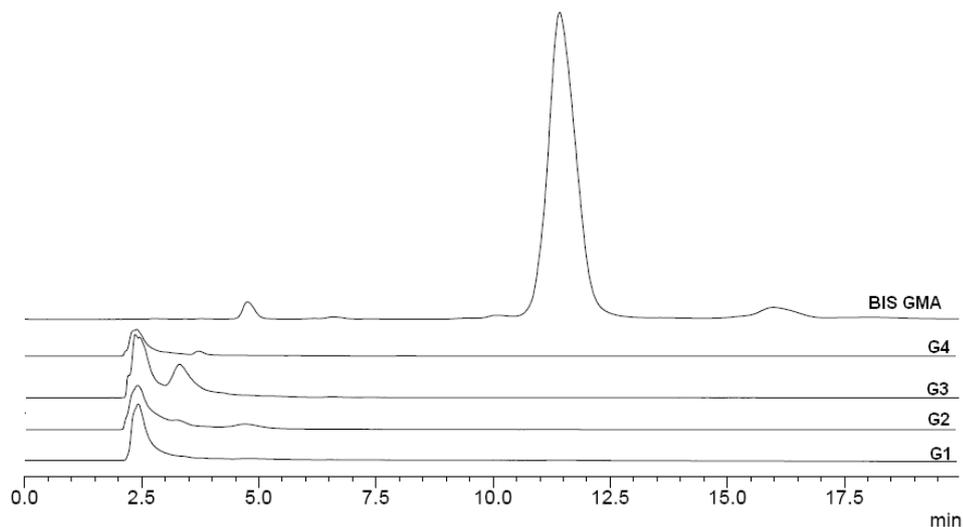
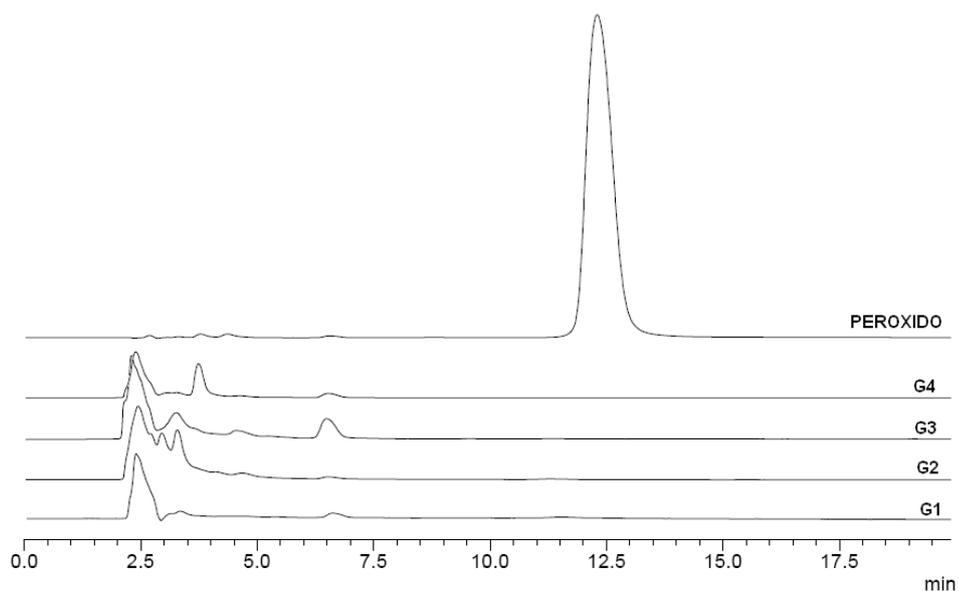


Figura 25 - Cromatogramas sobrepostos dos extratos em relação ao padrão de peróxido de benzoíla. Pode-se observar a formação de um pico em 12,3 min (240 nm) com o padrão de peróxido de benzoíla. Note que não há formação de picos em 12,3 min quando foram analisados os extratos obtidos de todos os cimentos, bem como do meio de cultura (Controle).



5.5 Avaliação do pH dos extratos

Imediatamente antes de serem aplicados sobre as células em cultura, os extratos obtidos dos cimentos avaliados neste estudo in vitro apresentaram pH de 5.80, 8.17 e 8.25 para os grupos G2, G3 e G4, respectivamente. No grupo controle (G1) o pH era de 8.23. Após terem sido aplicados sobre as células pelo período de 24hs, os extratos dos grupos G2, G3 e G4 passaram a apresentar pH de 5.99, 7.78 e 7.64, respectivamente. Para G1, o valor de pH era de 7.69.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Para proceder a restauração indireta de uma cavidade com exposição de dentina, um material cimentante adequado deve ser utilizado¹⁹⁻²⁰. Este material, além de promover união/adesão mecânica satisfatória entre a restauração e o elemento dental, deve também apresentar biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar^{26, 37, 49}. No entanto, a maioria dos cimentos resinosos utilizados atualmente, liberam componentes comprovadamente citotóxicos, os quais podem causar danos para células pulpares³⁴.

No presente estudo, a avaliação da citotoxicidade direta de diferentes cimentos foi realizada através da exposição de diferentes culturas de células pulpares aos extratos obtidos dos materiais. Esta metodologia, apesar de possuir limitações, está estabelecida pela International Organization for Standardization²⁵ e tem sido amplamente usada por diversos pesquisadores para avaliar os efeitos tóxicos de diferentes materiais dentários^{3, 13, 34, 44-43, 47, 52}. Assim, foi possível demonstrar que a aplicação do CIVMR Rely X Luting 2 (G2) causou intenso efeito citotóxico sobre células pulpares em cultura, levando a 100% de morte celular por necrose. Esses dados corroboram com Souza et al.⁴⁷ (2006), os quais observaram que os CIVMRs Vitremer, Vitrebond e Rely X Luting (um antecessor do Rely X Luting 2) causam significativo efeito citopático sobre células odontoblastóides MDPC-23 em cultura. Porém, os autores demonstraram que o Rely X Luting foi o cimento menos citotóxico, sendo que este resultado foi atribuído à presença de persulfato de potássio, o qual favorece a reação de polimerização do produto. Num estudo posterior, foi avaliada a citotoxicidade de um cimento de hidróxido de cálcio, bem como dos cimentos Vitrebond, Rely X Luting e Rely X Unicem³⁴. Foi demonstrado que apesar do cimento Rely X Luting ter sido o CIVMR menos citotóxico, a redução da viabilidade celular neste grupo foi bastante drástica. Os autores também sugeriram que o persulfato de potássio presente no cimento poderia ter reduzido os efeitos tóxicos causados pelo Rely X Luting sobre células pulpares em cultura. Na presente pesquisa, a ausência de monômeros tóxicos (HEMA e TEGDMA) nos extratos obtidos do Rely X Luting 2 (G2 - analisados por HPLC), também poderia ser explicada pela adição de persulfato de potássio na composição deste cimento. Todavia, a presença deste componente químico neste cimento

resinoso não foi suficiente para reduzir seu intenso efeito tóxico sobre as células pulpares, o que nos permitiu especular que o baixo pH do extrato obtido (5.80 antes e 5.99 após aplicação sobre as células), tenha sido a principal causa dos danos celulares irreversíveis, caracterizados pela intensa necrose. Deve-se considerar, ainda, que a solubilização deste cimento em meio de cultura, comprovada pela análise dos extratos em EDS, resultou na liberação de C, O, Ca e Si (compatíveis com a composição química do cimento), os quais podem ter contribuído para a ação tóxica dos extratos sobre ambos os tipos celulares usados neste estudo.

Foi demonstrado por De Souza Costa et al.¹¹ (2006) que cimentos autocondicionantes, os quais não necessitam de qualquer pré-tratamento da dentina antes de sua aplicação, são biocompatíveis com o complexo dentino-pulpar. No presente estudo, apesar do extrato obtido do cimento resinoso autocondicionante Rely X U200 (G3) ter sido aplicado diretamente em contato com células em cultura, foi observado apenas um moderado efeito tóxico sobre as células MDPC-23, sendo que um aumento de viabilidade foi observado para as HDPCs. Cabe ressaltar que o Rely X U200 (G3) apresentou pH (8.17 antes e 7.78 após aplicação sobre as células) semelhante ao grupo controle (8.23 antes e 7.69 após aplicação sobre as células), o que contrasta com o cimento Rely X Luting 2 (G2), o qual apresentava pH ácido durante todo tempo que permaneceu sobre as células em cultura. Além disso, o cimento Rely X U200 (G3) apresenta uma reação ácido-base, além da reação de polimerização, o que pode ter contribuído por seu menor efeito tóxico comparado ao Rely X Luting 2 (G2). No estudo realizado por Mendonça et al.³⁴ (2007), o cimento resinoso autocondicionante Rely X Unicem causou discreta citotoxicidade sobre células MDPC-23, o que não era inicialmente esperado devido ao fato deste material conter Bis-GMA, um monômero resinoso altamente tóxico. Todavia, os autores relataram que o Bis-GMA possui elevado peso molecular e baixa solubilidade (monômero hidrófobo), o que dificultaria sua solubilização e acúmulo no extrato aplicado sobre as células em cultura. Além disso, a presença de persulfato de sódio, um iniciador inorgânico da reação de polimerização, bem como de grande quantidade de partículas inorgânicas na composição do Rely X Unicem, poderiam ter limitado os efeitos citotóxicos deste cimento resinoso. O Rely X U 200 usado na presente pesquisa não apresenta Bis-GMA na sua composição, sendo que a quantidade de partículas inorgânicas (45-55% em peso) é menor do que àquela

encontrada no Rely X Unicem. Assim, talvez a discreta presença de TEGDMA, determinada por HPLC no extrato do Rely X U200, pode ter sido responsável pela moderada citotoxicidade do material. Tem sido relatado que o TEGDMA exerce efeito tóxico significativo sobre diferentes tipos celulares de maneira dose-dependente^{4, 15, 18, 27, 42, 48}. Além disso, baixas concentrações deste monômero são capazes de causar intenso efeito tóxico sobre células em cultura⁶.

Na presente pesquisa, a análise dos extratos em HPLC determinou a presença do persulfato de sódio em todos os grupos experimentais. Todavia, a detecção deste mesmo agente químico no grupo controle (G1), indica que ocorreu um resultado falso positivo, pois o meio de cultura possui piruvato de sódio, o qual apresenta estrutura química bastante semelhante ao persulfato de sódio. Porém, os extratos de G3 apresentaram elevada concentração deste composto químico, denotando que possivelmente as quantidades de piruvato de sódio e persulfato de sódio tenham se somado. Apesar de não se ter na literatura dados sobre a citotoxicidade do persulfato de sódio, os resultados de viabilidade celular obtidos para G3 na presente pesquisa mostram que a quantidade deste produto liberado no extrato não foi suficiente para causar danos significativos para as células em cultura.

Foi demonstrado, também, no presente estudo, que as células pulpares em cultura responderam aos efeitos do extrato do cimento Rely X U200 (G3) de maneira diferente. As células MDPC-23 mostraram-se mais sensíveis aos efeitos deste cimento resinoso avaliado do que as HDPCs. Estes resultados corroboram com os encontrados por Yasuda et al.⁵³ (2008), os quais testaram materiais resinosos (adesivos dentinários) sobre uma cultura primária de células da polpa e células MDPC-23. Os autores observaram que as células odontoblastóides foram de 5 a 24% mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos materiais resinosos do que as HDPCs. Assim, a maior resistência das HDPCs poderia estar relacionada ao fato destas células serem menos diferenciadas do que as células MDPC-23. Yasuda et al.⁵³ (2008) sugeriram, ainda, que as características intrínsecas de cada espécie celular (MDPC-23 – de ratos e HDPCs – humana), bem como o processo de imortalização da cultura, poderiam tornar as células MDPC-23 mais sensíveis aos efeitos tóxicos dos materiais resinosos.

Tem sido relatado que cimentos resinosos convencionais, quando usados em associação com o condicionamento ácido da dentina e sistemas adesivos, podem

causar efeitos citotóxicos mais intensos do que os cimentos autocondicionantes¹¹. Todavia, na presente investigação o cimento resinoso convencional Rely X ARC (G4), o qual requer pré-tratamento da dentina para que possa ser usado clinicamente, não apresentou efeitos tóxicos significantes sobre as células pulpares. Tal fato pode ser atribuído à metodologia empregada no estudo, onde o material dentário não foi associado a qualquer agente ácido ou sistema adesivo. Apesar do cimento Rely X ARC possuir uma mistura de monômeros considerados tóxicos, Bis-GMA e TEGDMA, estes monômeros apresentam alto peso molecular e são hidrofóbicos, além disso, este cimento apresenta grande quantidade de partículas inorgânicas (Tabela 1) na sua composição e tempo de fotopolimerização relativamente longo (40 segundos), o que pode ter reduzido a solubilidade do material dentro das 24hs em que os corpos de prova permaneceram imersos no meio de cultura. Ergun et al.¹³ (2011) avaliaram os efeitos da redução do tempo de polimerização de cimentos resinosos sobre a viabilidade de células L929 em cultura. Os autores mostraram que o cimento resinoso Rely X ARC, quando fotopolimerizado por 40 segundos, apresentava limitado efeito tóxico sobre as células L929. Na presente pesquisa, apesar de ter sido detectado a presença de TEGDMA nos extratos dos cimentos Rely X U200 (G3) e Rely X ARC (G4), a concentração deste monômero no meio de cultura não foi alta suficiente para desencadear intensos efeitos tóxicos sobre as células pulpares avaliadas. Tem sido demonstrado que estímulos de baixa intensidade podem sobre-regular o metabolismo e a proliferação celular^{33, 46}. Este fato pode explicar a tendência de aumento na viabilidade das HDPCs expostas os extratos dos grupos G3 e G4. Cabe ressaltar que a análise das amostras em EDS demonstrou que apenas uma pequena quantidade de partículas compatíveis com a composição do material foram observadas, caracterizando a baixa solubilidade do cimento quando imerso em líquido.

Chang et al.⁶ (2012) relataram que, dependendo da intensidade dos efeitos tóxicos causados pelos monômeros, estes podem induzir morte celular tanto por apoptose quanto por necrose. Na presente pesquisa, a morte celular observada, principalmente no grupo G2, foi predominantemente por necrose. Neste tipo de morte, as células lesadas são incapazes de manter a integridade da membrana plasmática, permitindo o extravasamento do conteúdo intracelular¹⁶. Tal como discutido anteriormente, a intensa morte celular por necrose observada em G2 pode

estar associada ao pH ácido do extrato aplicado sobre as células por 24 hs. Todavia, pode-se sugerir que a reduzida presença de TEGDMA no extrato do grupo G3 tenha causado um discreto efeito tóxico caracterizado pela redução da viabilidade celular e morte das células MDPC-23, as quais são mais sensíveis do que as HDPCs. Sabe-se que o TEGDMA causa uma drástica e rápida depleção da GSH em células pulpares, a qual é acompanhada pelo aumento da produção de ROS⁴⁸. Conseqüentemente, o desequilíbrio entre a formação e a eliminação de ROS nas células causa o estresse oxidativo, o que pode resultar em danos celulares irreversíveis, como a peroxidação lipídica com amplas áreas de lesão nas membranas das células. Atualmente, os mecanismos moleculares envolvidos na produção de ROS induzido por TEGDMA devem ser melhor elucidados; porém, estima-se que grupamentos ésteres deste monômero reajam com a GSH inativando-a e reduzindo sua síntese, o que resulta no aumento na produção de ROS. Lefevre et al.²⁸ (2005) sugeriram que a morte das células expostas ao TEGDMA ocorre devido ao aumento de ROS intracelular após o esgotamento completo de GSH, pois este monômero resinoso causa depleção direta desta enzima antioxidante. Os autores relataram ainda, que durante o processo de respiração celular, ocorre a formação de H₂O₂, o qual pode interagir com ions Fe²⁺ presentes nas mitocôndrias das células. O resultado dessa interação (reação de Fenton) é a formação de íons hidroxila (OH⁻), os quais são extremamente tóxicos para as células. Assim, a depleção celular de GSH causada pela ação dos monômeros resinosos, associado ao aumento de íons OH⁻ livres, desencadeiam a peroxidação lipídica com a conseqüente morte das células.

Os resultados obtidos na presente pesquisa devem ser analisados com cautela e não devem ser extrapolados de imediato para situações clínicas⁵². Todavia, os dados científicos relevantes e originais apresentados neste estudo in vitro indicam, de maneira comparativa, que o cimento resinoso Rely X Luting 2 (G2) é mais tóxico do que os cimentos Rely X U200 (G3) e Rely X ARC (G4). Todavia, em situações clínicas, todos estes cimentos são usados sobre um substrato dentinário com limitada umidade, o que pode tornar o material menos solúvel do que observado neste estudo, onde os materiais foram imersos em meio de cultura; também, a presença de prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos e colágeno no interior dos túbulos da dentina, bem como a exsudação de fluido

dentínario, dificultam a difusão transdentínaria de componentes liberados destes materiais para causar danos para as células pulpaes. Cabe ressaltar que apesar do cimento convencional Rely X ARC (G4) não ter sido considerado citotóxico na presente pesquisa laboratorial, clinicamente este material é aplicado sobre uma dentina previamente condicionada com ácido e tratada com um agente adesivo. Dentro deste contexto, este material pode se tornar tóxico, tal como demonstrado in vivo para outro cimento resinoso convencional¹¹. Assim, futuros estudos in vitro utilizando barreira dentínaria ou mesmo investigações in vivo usando dentes humanos, devem ser realizados para determinar a aplicabilidade clínica segura dos cimentos resinosos amplamente usados para cimentação de peças protéticas em dentes vitais.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia usada na presente pesquisa, foi possível concluir que:

- O cimento Rely X Luting 2 causou intenso efeito citotóxico para ambas culturas de células pulparem usadas neste estudo.
- Rely X U 200 apresentou apenas discreta citotoxicidade sobre as células em cultura.
- O cimento Rely X ARC não foi tóxico para as células pulparem em cultura.

Referências

REFERÊNCIAS*

1. Altintas SH, Usumez A. Evaluation of TEGDMA leaching from four resin cements by HPLC. *Eur J Dent.* 2012; 6 (3): 255-62.
2. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36 (6): 1367-73.
3. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effect of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2009; 672 (2): 103-12.
4. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Effects of HEMA and TEGDMA on the in vitro odontogenic differentiation potential of human pulp stem/progenitor cells derived from deciduous teeth. *Dent Mater.* 2011; 27 (6): 608-17.
5. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. *J Oral Rehabil.* 1998; 25 (1): 45-51.
6. Chang HH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Chan CP, Wang TM, et al. Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanoids production in human dental pulp cells. *Inter End J.* 2012; 45 (9): 848-58.
7. Costa CA, Teixeira HM, Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod.* 2000; 26 (9): 512-6.
8. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013; 92 (9) : 765-72.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

9. De Munck J, Vargas M, Landuyt KV, Hikita K, Lambrechts P, Meerbeek BV. Bonding of an auto-adhesive luting material to enamel and dentin. *Dent Mater.* 2004; 20 (10): 963-71.
10. De Souza Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. *Dent Mater.* 2002; 18 (7): 543-51.
11. De Souza Costa CAS, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dent Mater.* 2006; 22 (10): 954-62.
12. De Souza Costa CA, Ribeiro APD, Giro EMA, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater.* 2011; 27 (7): 158-70.
13. Ergun G, Egilmez F, Yilmaz S. Effect of reduced exposure times on the cytotoxicity of resin luting cements cured by high-power led. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19 (3): 286-92.
14. Estrela C. *Ciência endodôntica.* São Paulo: Artes Médicas; 2004.
15. Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, et al. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2011; 90 (2): 257-63.
16. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Deffer.* 2012; 19 (1): 107-20.
17. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996; 24 (1-2): 125-8.

18. Geurtsen W, Lehman F, Spahl W, Leyhausin G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41 (3): 474-80.
19. Goodacre CJ. Designing tooth preparations for optimal success. *Dent Clin N Am.* 2004; 48 (2): 359-85.
20. Goodacre CJ, Campagni WV, Aquilino SA. Tooth preparations for complete crowns: an art form based on scientific principles. *J Prosthet Dent.* 2001; 85 (4): 363–76.
21. Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil.* 1997; 24 (1): 20-5.
22. Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR, editors. *Seltzer and Bender's dental pulp*, 2nd ed. Chicago: Quintessence; 2012.
23. Hebling J, Ribeiro APD, de Souza Costa CA. Relação entre materiais dentários e o complexo dentino-pulpar. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 18 (48): 1-9.
24. Hill EE. Dental cements for definitive luting: a review and practical clinical considerations. *Dent Clin North Am.* 2007; 51 (3): 643-58.
25. International Organization for Standardization: ISO 10993-5:1999(E). *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 2nd ed. Gêneve: ISO; 1999.
26. Ladha K, Verma M. Conventional and contemporary luting cements: an overview. *J Indian Prosthodont Soc.* 2010; 10 (2): 79-88.

27. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater.* 2006; 22 (12): 1086-92.
28. Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2005; 26 (25): 5130-7.
29. Lenzi T, Guglielmi CAB, Arana-Chavez VE, Raggio DP. Tubule density and diameter in coronal dentin from primary and permanent human teeth. *Microsc Microanal.* 2013; 19 (6): 1-5.
30. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4 (5): 679-728.
31. Macorra JC, Pradies G. Conventional and adhesive luting cements. *Clin Oral Invest.* 2002; 6 (4): 198-204.
32. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cell and macrophages. *Dent Mater.* 2006; 22 (5): 434-40.
33. Matsui S, Takahashi C, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of low-concentration reactive oxygen species on calcification ability of human dental pulp cells. *J Endod.* 2009; 35 (1): 67-72.
34. Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104 (4): e102-8.
35. Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent.* 2006; 31 (6):633-42.

36. Özcan M, Mese A. Adhesion of conventional and simplified resin-based luting cements to superficial and deep dentin. *Clin Oral Invest.* 2012; 16 (4): 1081-8.
37. Pameijer CH. A review of luting agents. *Int J Dent.* 2012; 2012: 1-7.
38. Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43 (10): 1394-408.
39. Pashley DH. Dentine permeability and its role in the pathobiology of dentine sensitivity. *Arch Oral Biol.* 1994; 39 Suppl: 73S-80S.
40. Pashley DH. Dynamics of the pulpodentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7 (2): 104–33.
41. Pashley DH, Pashley EL, Carvalho RM, Tay FR. The effects of dentin permeability on restorative dentistry. *Dent Clin N Am.* 2002; 46 (2): 211-45.
42. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennidon JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995; 74 (9): 1602-6.
43. Sahabi M, Sattari M, Romoozi E, Baghban AA. Cytotoxicity comparison of harvard zinc phosphate cement versus Panavia F2 and Rely X Plus resin cements on Rat L929-fibroblasts. *Cell J.* 2011; 13 (3): 163-8.
44. Schmid-Schwap M, Franz A, König F, Bristela M, Lucas T, Piehslinger E. Cytotoxicity of four categories of dental cements. *Dent Mater.* 2009; 25 (3): 360-8.

45. Silva JMF, Rodrigues JR, Camargo CHR, Fernandes Jr VVB, Hiller KA, Schweikl H, et al. Effectiveness and biological compatibility of different generations of dentin adhesives. *Clin Oral Invest*. 2014; 18 (2): 607-13.
46. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent*. 2014; 42 (2): 185-98.
47. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling J, Giro EMA, de Souza Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2006; 22 (9): 838-44.
48. Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res*. 2003; 66 (3): 476-82.
49. Sumer E, Deger Y. Contemporary permanent luting agents used in dentistry: a literature review. *Int Dent Res*. 2011; 1: 26-31.
50. Trubiani O, Cataldi A, De Angelis F, D'Arcangelo C, Caputi S. Overexpression of interleukin-6 and -8, cell growth inhibition and morphological changes in 2-hydroxyethyl methacrylate-treated human dental pulp mesenchymal stem cells. *Inter Endod J*. 2012; 45 (1): 19-25.
51. Ulker HE, Sengun A. Cytotoxicity evaluation of self-adhesive Composite Resin Cements by dentin barrier test on 3D Pulp Cells. *Eur J Dent*. 2009; 3 (2): 120-6.
52. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater*. 2012; 28 (1): 23-40.

53. Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil.* 2008; 35 (12): 940-6.

Anexo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CITOTOXICIDADE DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DE AGENTES PARA CIMENTAÇÃO DE RESTAURAÇÕES INDIRETAS SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA E CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS

Pesquisador: Carlos Alberto de Souza Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13638613.7.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 296.630

Data da Relatoria: 18/06/2013

Apresentação do Projeto:

CITOTOXICIDADE DIRETA E TRANSDENTINÁRIA DE AGENTES PARA CIMENTAÇÃO DE RESTAURAÇÕES INDIRETAS SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA E CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES HUMANAS

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desta pesquisa será avaliar a citotoxicidade direta e transdentinária, sobre células odontoblastóides MDPC-23 e uma cultura primária de células pulpares humanas, de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e cimentos resinosos (auto-adesivo e convencional) utilizados em clínica para cimentação de restaurações indiretas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para o desenvolvimento da pesquisa, será necessária a coleta de células pulpares de terceiros molares com indicação de exodontia. Os dentes também terão suas coroas aproveitadas para confeccionar câmaras pulpares artificiais. Os riscos do sujeito de pesquisa são inerentes ao procedimento cirúrgico e o paciente terá como benefício a exodontia do terceiro molar, que quando indicada e não realizada podem trazer sérios prejuízos ao paciente.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 296.630

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa esta bem delineada e o assunto é de relevância científica. O pesquisador possui experiência no tema proposto. O paciente irá participar do projeto de forma indireta, doando seus terceiros molares com indicação de exodontia, não receberá nenhum tratamento experimental.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou a documentação exigida.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo com as normas do CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendida a solicitação de reunião. Considerado aprovado sem recomendações.

ARARAQUARA, 07 de Junho de 2013

Assinador por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br, mnagle@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor.)

Araraquara, 25 de fevereiro de 2014.

ELAINE CRISTINA VOLTOLINI PONTES