

**Universidade Estadual Paulista
UNESP**

Andreza Maria Fábio Aranha

**EFEITO DO TEMPO DE FOTOATIVÇÃO NA
CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS DE
IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADOS POR
RESINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM
ODONTOBLÁSTICA**

ARARAQUARA

2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Andreza Maria Fábio Aranha

**EFEITO DO TEMPO DE FOTOATIVAÇÃO NA
CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE
VIDRO MODIFICADOS POR RESINA EM CÉLULAS DE
LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

ARARAQUARA

2004

Aranha, Andreza Maria Fábio
Efeito do tempo de fotoativação na citotoxicidade de
cimentos de ionômero de vidro modificados por resina em células
de linhagem odontoblástica / Andreza Maria Fábio Aranha. –
Araraquara : [s.n.], 2004.
133 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia.
Orientadora : Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro.
Co-orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa.

1. Teste de materiais 2. Cimentos de ionômeros de vidro
3. Odontoblastos. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Andreza Maria Fábio Aranha

NASCIMENTO 19.11.76 - Bauru - SP

FILIAÇÃO Antonio Carlos Bourgogne Aranha
Maria Salete Fábio Aranha

1995/1998 ***Curso de Graduação em Odontologia***
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, UNESP - Araraquara, São Paulo,
Brasil.

2000/2002 ***Especialização em Odontopediatria.***
Hospital de Reabilitação de Anomalias
Crâniofaciais, USP, SP, Brasil.

2002/2004 ***Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de***
Odontopediatria, Nível Mestrado, na
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, UNESP - Araraquara, São Paulo,
Brasil.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Campus de Araraquara

Andreza Maria Fábio Aranha

**EFEITO DO TEMPO DE FOTOATIVAÇÃO NA CITOTOXICIDADE
DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADOS POR
RESINA EM CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA**

COMISSÃO EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Profa. Dra. Josimeri Hebling

3º Examinador: Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

Araraquara

2004

FILOSOFIA DO SUCESSO

“Napoleon Hill”

**“Se você pensa que é um derrotado”,
você será um derrotado.**

**Se não pensar, quero intensamente,
Não conseguirá nada.**

**Mesmo que você queira vencer,
mas pensa que não vai conseguir,
A vitória não sorrirá para você.**

**Se você fizer as coisas pela metade,
você será um fracassado.
Nós descobrimos neste mundo,
Que o sucesso começa pela intenção da gente
e tudo se determina pelo nosso espírito.**

**Se você pensa que é um malogrado,
você se torna como tal.**

**Se você almeja atingir uma posição mais elevada deve, dotar-se da
convicção de que conseguirá infalivelmente**

A luta pela vida nem sempre é vantajosa

Aos fortes, nem aos espertos.

Mais cedo ou mais tarde,

Quem cativa a vitória é aquele que crê plenamente:

EU CONSIGUIREI!”

Dedico este trabalho...

À minha mãe,

pelo seu amor, dedicação e por manter-se forte o bastante para garantir a união e a felicidade de todos na nossa família.

Ao meu pai,

por seu apoio, incentivo e carinho
em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Gustavo e Maíra,

pelos momentos de alegria, de amor e de amizade.

Ao Luba,

meu companheiro, meu amigo, meu amor,
por me fazer sorrir e estar sempre ao meu lado,
apoando e incentivando.

Agradecimentos Especiais

A Deus,

pela vida e por caminhar ao meu lado, nas horas mais difíceis, fortalecendo minha fé. Obrigada, Senhor!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa,

por sua atenção, incentivo e oportunidade de convivência e aprendizado. Minha admiração e gratidão.

Ao Pedro Paulo Chaves de Souza

por sua paciência e dedicação em nossos primeiros passos no laboratório de cultura de células, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

À Profa. Dra. Josimeri Hebling

pelos conselhos, apoio, carinho e pela disponibilidade durante a análise estatística.

Agradecimentos Especiais

À Elisa,

minha doce orientadora, professora e amiga que com paciência, dedicação e carinho esteve sempre comigo e por quem tenho grande admiração.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, nas pessoas de seu ex-diretor, **Prof. Dr. Ricardo Samih George Abi Rached**, diretor, **Prof. Dra. Rosimary Adriana Chiérici Marcantonio** e o vice-diretor **Prof. Dr. Luis Cláudio Martins Segalla**.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria, **Lourdes Aparecida dos Santos-Pinto, Fábio C. Braga de Abreu e Lima, Cyneu Aguiar Pansani, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Rita de Cássia Loiola Cordeiro**, pela disponibilidade de ensinar com dedicação e carinho.

Aos demais professores do curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, **Cris Duque, Luciana, Cris Motisuki, Renata, Juliana, Júnia, Fabíola, Emi, Pedro, Érica, Murilo, Hermes, Fábio e Jonas** pela convivência, alegria e companheirismo.

À minha grande amiga **Cristina**, por todos os conselhos e sugestões, pela amizade, carinho e apoio.

Às minhas amigas e companheiras, **Fernanda e Carol**, que estiveram sempre ao meu lado durante todo este trabalho.

Aos meus queridos amigos, **Midori, Consuelo, Letícia, Virgínia, Suzana, Juliana, Mayra, Roberta, Renata, Pati, Mel, Zé Henrique, Binho, Fau, Sabrina, Pedro, Priscila, tia Lú, tio Hélio, Flora e Dú**, que me acompanharam durante toda esta trajetória e tornaram meus finais de semana e feriados muito mais coloridos.

Ao **Fábio**, por me ajudar com a apresentação do projeto e por estar sempre à disposição!

Aos meus amigos do Grupo de Biologia Molecular, **Adriano, Pedro, Sabrina, Kina, Cristiane, Mariana e Giovanni** pela troca de informações e aprendizado.

À **Glorinha e Andréa** do Laboratório de Patologia,
pela dedicação ao departamento.

À **Neide** por minimizar minhas preocupações,
tornando minha casa um ambiente agradável.

Aos funcionários do Departamento de Clínica
Infantil, especialmente à **Sílvia** e à **Dulce**, pela amizade e apoio.

Ao Sr. **Sebastião Anésio Dametto**, técnico do
Instituto de Química de Araraquara – UNESP, pela sua colaboração
durante a avaliação microscópica.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação,
Mara, Rosângela, Vera e Sílvia pelo auxílio e dedicação.

Aos funcionários da biblioteca, em especial à
Maria José Peron, pela revisão das Referências e à **Sílvia, Adriano**
e **Eliane** pelo bom humor e dedicação.

Aos meus queridos amigos do xeróx, **Wellington** e **Marquinhos** pela alegria e descontração.

Ao **Marcelo** do Departamento de Morfologia, **Dr. Alessandro Galhardo e Josiel Hebling** pelo auxílio durante meu projeto anterior.

Ao Professor, **Dr. Ricardo Marins**, que cedeu gentilmente a solução de HEMA utilizada neste experimento.

À **CNPQ**, pela bolsa de estudo concedida.

À **todos** aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!!

**“Embora ninguém possa voltar
atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode agora fazer
um novo fim.”**

Chico Chavier

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DA LITERATURA	20
PROPOSIÇÃO	62
MATERIAIS E MÉTODOS	64
A. Cultivo das células	64
B. Confecção dos corpos de prova	65
C. Avaliação da citotoxicidade	72
1. Atividade metabólica celular	72
2. Análise da morfologia celular	76
D. Tratamento estatístico dos resultados	79
RESULTADOS	82
1. Atividade metabólica celular	82
2. Análise da morfologia celular	90
DISCUSSÃO	97
CONCLUSÃO	113
REFERÊNCIAS	115
RESUMO	125
ABSTRACT	128
APÊNDICE	131

INTRODUÇÃO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) têm sido utilizados com frequência como materiais restauradores, forradores e como selantes oclusais, principalmente em odontopediatria. Estes materiais foram introduzidos por Wilson e Kent ⁵¹ na década de 70, sendo compostos basicamente por pó de cristais de flúor-alumínio-silicato e líquido contendo solução aquosa de copolímeros ácidos, como os ácidos poliacrílico, itacônico e tartárico.

A adesão à estrutura dentária ^{34, 38} e a liberação de íons flúor ^{10, 11} representam algumas das vantagens dos CIVs convencionais. Entretanto, estes materiais apresentam limitações quanto à resistência ao desgaste, à compressão e à solubilidade ^{34, 38}.

Com o intuito de aprimorar as propriedades mecânicas e manter as vantagens dos cimentos de ionômero de vidro convencionais, foram introduzidos no mercado, no final da década de 80, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs) ³⁵

Os CIVMRs são constituídos por componentes dos CIVs convencionais, bem como pelo monômero hidrofílico, 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) e por iniciadores de polimerização, componentes das resinas compostas ^{46, 50}.

A combinação destes componentes determinou o desenvolvimento da presa dos CIVMRs por dois mecanismos diferentes, a reação ácido-base dos cimentos de ionômero de vidro convencionais ^{3, 50, 51} e a polimerização do monômero por meio da luz, como nas resinas compostas ⁵⁰. Em alguns materiais, a incorporação de iniciadores químicos é responsável pela reação de polimerização química dos componentes monoméricos ^{3, 46}. Assim, a massa final dos CIVMRs consiste em partículas de vidro embebidas em uma matriz de poliácidos e monômeros polimerizados ⁴⁶.

A introdução do sistema de fotoativação aos CIVs foi responsável pela possibilidade de controle do tempo de trabalho e pelo aumento da resistência à contaminação inicial do material pela água ^{24, 50}, em função da proteção da reação ácido-base por meio da formação da matriz polimérica ^{3, 50}. O processo ideal de polimerização de materiais resinosos ocorre quando há conversão máxima dos monômeros em polímeros, garantindo boas propriedades físicas, mecânicas e biológicas para as restaurações ^{3, 42}. Uma subpolimerização dos compostos resinosos pela baixa intensidade de luz ou pelo reduzido tempo de fotoativação pode resultar em conversão inadequada dos monômeros em polímeros nas áreas mais profundas das restaurações ⁴². Uma vez que estes apresentam em sua estrutura ambos os grupos, hidrofílico e hidrofóbico e têm baixo peso molecular, quando não reagem de forma adequada são liberados

pelo material, podendo se difundir facilmente através da dentina ² e provocar efeitos citotóxicos, agredindo o tecido pulpar ^{2, 47}, principalmente quando aplicados sobre espessura reduzida de dentina ⁸.

A literatura mostra que quanto maior a profundidade da cavidade e, portanto, menor a espessura da dentina, maior é o número e o diâmetro dos túbulos dentinários, o que pode facilitar a penetração de componentes tóxicos dos materiais odontológicos para o interior do tecido pulpar ⁸. Nestes casos, torna-se necessário o forramento das cavidades com materiais que promovam o selamento adequado da estrutura dentária remanescente, apresentem propriedades antimicrobianas e principalmente, que sejam biocompatíveis com o tecido pulpar ^{4, 17}.

Nos CIVs convencionais, a liberação de íons alumínio, sódio, flúor, silicato, cálcio, zinco e estrôncio com a degradação do material tem sido apontada como a causa principal da citotoxicidade ^{22, 36}. Entretanto, inúmeros estudos *in vitro* têm demonstrado que os efeitos citotóxicos dos CIVMRs são mais evidentes quando comparados àqueles dos CIVs convencionais ^{9, 21, 22, 28, 30} e isso é atribuído em grande parte, à incorporação de HEMA ^{2, 6, 16}.

Portanto, considerando a importância da adequada conversão dos monômeros resinosos em polímeros nos CIVMRs utilizados para forramento,

torna-se essencial estudar a citotoxicidade destes materiais quando submetidos a diferentes tempos de fotoativação.

Dentre as várias metodologias recomendadas para a avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos, os testes *in vitro* em culturas de células têm sido muito utilizados ^{2, 6, 9, 19, 29, 30, 31, 36} e, embora não exista consenso com relação ao tipo celular mais indicado para esta avaliação ³³, as células da linhagem odontoblástica MDPC-23 (*Mouse Dental Papillae Cell*) têm sido utilizadas, principalmente, por produzirem duas proteínas exclusivas dos odontoblastos, a fosfoforina e a sialoproteína da dentina ²⁰.

REVISÃO DA LITERATURA

Com a finalidade de produzir um cimento restaurador híbrido, fluoretado e que apresentasse propriedades mecânicas superiores às dos cimentos de ionômero de vidro convencionais (CIV), Mathis e Ferracane ³⁵ (1989) misturaram o líquido de um cimento de ionômero de vidro (Fuji II) com uma resina fotopolimerizável experimental, na proporção, em peso, de 87% para 13%, respectivamente. Este cimento híbrido fotopolimerizável foi avaliado quanto à força de compressão, ao módulo de elasticidade, à resistência à fratura e à tração. A adesão à dentina, a solubilidade em água e a rugosidade superficial também foram analisadas. Os resultados sugeriram que as propriedades mecânicas do material estudado foram superiores às daquelas dos cimentos de ionômero de vidro convencionais, sendo que a solubilidade foi menor e a adesão à dentina não foi afetada. A composição híbrida do material testado proporcionou também, uma redução do desenvolvimento de trincas na superfície quando este foi desidratado.

A partir deste trabalho, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina passaram a ser estudados com o objetivo de compreender melhor o

mecanismo de presa, e as alterações de pH e de temperatura que ocorrem durante este processo.

Woolford ⁵² (1989) investigou as alterações do pH da superfície de quatro cimentos de ionômero de vidro para forramento (Baseline, Ketac Bond-pó e líquido, Ketac Bond-cápsula, GI Liner), ao longo do tempo. Os valores do pH da superfície dos materiais foram registrados por meio de eletrodo conectado a um medidor de pH. Todos os cimentos avaliados mostraram uma liberação lenta e contínua de ácido por cerca de 24 horas, sendo que nos primeiros 60 minutos da presa, o pH da superfície se manteve baixo. Os resultados indicaram que os cimentos de ionômero de vidro para forramento estudados se comportaram de forma diferente com relação à liberação de ácido, tendo o GI Liner o maior pH da superfície ao longo do tempo e o Ketac Bond-cápsula, o menor.

Segundo Wilson ⁵⁰ (1990), os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina são compostos pelo pó dos cimentos de ionômero de vidro convencionais (cristais de vidro flúor-alumínio-silicato, ácido tartárico e ácido poliacrílico) e no líquido, há uma mistura de água e do monômero resinoso 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), iniciadores e ativadores solúveis

em água para a polimerização do HEMA. A aglutinação do pó ao líquido produz cimentos que apresentam mecanismo de presa dual: reação ácido-base dos CIVs convencionais e polimerização dos radicais livres ou fotoquímica semelhante às resinas compostas. A reação ácido-base ocorre de forma lenta em função da fotopolimerização, formando uma matriz de hidrogel de polissais, enquanto a fotoativação realiza a conversão do monômero (HEMA) em matriz polimérica. A incorporação de ácido poliacrílico modificado ao líquido destes cimentos impede a separação das duas fases durante o processo de presa determinando a união química da matriz de poli-HEMA com a matriz de poliacrilato. Os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina apresentam como vantagens, o tempo de trabalho mais extenso, a rápida polimerização, a alta resistência inicial e a adesão às resinas compostas. Por outro lado, a presença de monômeros tóxicos em sua composição e a opacidade são algumas de suas desvantagens.

Bourke et al.³ (1992) avaliaram os efeitos da ativação por luz de dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento (Vitrebond, XR Ionomer) e verificaram se a reação química de polimerização continuava nestes cimentos após a fotopolimerização. Confeccionaram 10 espécimes de cada material, sendo que 5 foram fotopolimerizados por 30

segundos e os outros 5 não foram irradiados por luz. Para a avaliação da presa dos cimentos, registraram as alterações térmicas durante a polimerização e avaliaram a dureza das superfícies externa e interna de cada amostra em diferentes espessuras (0,5, 1,0, 1,5 ou 2,0 mm). O Vitrebond apresentou duas fases distintas durante a reação de presa: a ativação pela luz que resultou em endurecimento rápido do material com intenso aumento da temperatura e uma reação de presa mais lenta na ausência da fotoativação. A dureza da superfície externa dos corpos de prova aumentou rapidamente por até 1 hora após a fotoativação e então, continuou a aumentar gradualmente por 24 horas. A fotoativação do XR Ionomer aumentou a taxa de endurecimento do material, mas não houve evidências de reação de reação ácido-base. Os espécimes não irradiados por luz permaneceram flexíveis e amolecidos por até 1 hora após a polimerização. A irradiação pela luz por 30 segundos produziu endurecimento imediato até as espessuras de 1,5-2,0 mm em ambos os materiais. As diferentes composições dos cimentos para forramento determinaram comportamentos distintos durante o mecanismo de presa.

Woolford e Chadwick ⁵³ (1992) examinaram, ao longo do tempo, o pH da superfície de três cimentos de ionômero de vidro modificados por resina indicados para forramento, Baseline VLC (Dentisply), XR-Ionomer (Kerr) e

Vitrebond (3M-ESPE). Para tal finalidade, confeccionaram 10 corpos de prova de cada material, os quais foram apenas espatulados ou, espatulados e fotoativados por 30 segundos. Em seguida, os corpos de prova foram colocados em uma câmara central conectada a um medidor de pH, o qual foi registrado a cada 5 minutos durante 60 minutos. Para os três cimentos estudados e em ambas as condições, o valor do pH da superfície após 60 minutos foi mais alto que o valor inicial. Os valores do pH do Baseline VLC, do XR-Ionomer e do Vitrebond quando não fotoativados foram inicialmente 3,44; 2,96 e 4,06, respectivamente, enquanto que após 60 minutos foram de 4,08; 3,64 e 4,92. Porém, após a fotoativação os cimentos apresentaram inicialmente um pH de 3,55; 2,86 e 3,88 e aos 60 minutos, foram registrados valores do pH de 4,42; 3,61 e 5,17. A fotopolimerização dos materiais aumentou significativamente o pH da superfície do Baseline VLC e do Vitrebond aos 60 minutos, mas não exerceu influência para o XR-Ionomer. Os resultados confirmaram que as diferentes formulações dos cimentos determinam comportamentos únicos durante o processo de presa. Os autores sugeriram que embora as consequências do pH baixo da superfície dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento ainda não sejam claras, este pode ser um dos fatores etiológicos da irritação pulpar e da sensibilidade pós-operatória.

Kanchanavasita et al.²⁶ (1995) avaliaram o aumento da temperatura durante a reação de presa e as alterações dimensionais de cimentos de ionômero de vidro convencionais (Fuji II, Opusfil) e modificado por resina (Fuji II LC), de um compômero (Dyract) e de uma resina composta (Silux Plus). As mudanças na temperatura durante a presa foram registradas por meio de um dispositivo acoplado a um termômetro digital. Cinco espécimes de cada material foram confeccionados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes e os materiais termo-ativados foram fotoativados por 20, 30 ou 40 segundos. O cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC) demonstrou maior aumento da temperatura e maiores taxas de contração que os cimentos convencionais estudados. Em geral, o comportamento do Fuji II LC foi semelhante ao da resina composta e este exibiu um rápido aumento na temperatura durante a exposição da luz, alcançando o valor máximo em um período de tempo reduzido. Em seguida, com a remoção da fonte de luz, a temperatura decresceu imediatamente à temperatura ambiente. Os períodos prolongados de fotoativação não produziram aumento significativo da temperatura, mas estenderam o período de tempo antes da temperatura começar a declinar. A temperatura do ambiente exerceu influência significativa na taxa de alteração dimensional de alguns materiais. A contração de polimerização dos materiais fotoativados foi

diretamente proporcional ao aumento da temperatura durante a reação de presa. Os resultados indicaram que as reações de presa de todos os materiais estudados foram exotérmicas e o cimento de ionômero de vidro modificado por resina apresentou o maior aumento da temperatura. Portanto, a indicação deste material em cavidades profundas deve ser estudada cuidadosamente quanto aos efeitos adversos sobre o tecido pulpar.

Os mecanismos de presa de quatro cimentos de ionômero de vidro modificados por resina disponíveis no mercado, Fuji II LC (GC), Photac-Fil (3M-ESPE), Variglass (Caulk/Dentisply) e Vitremer (3M-ESPE) foram avaliados por Kakaboura et al.²⁴ (1996) por meio da espectroscopia FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Doze espécimes de cada material foram confeccionados de acordo com os seguintes tratamentos: A- Espatulados; B e C- Espatulados, fotoativados por 60s e mantidos por 20 minutos em ambiente seco e escuro; D- Espatulados, armazenados por 20 minutos em ambiente seco e escuro e fotoativados por 60s. A espectroscopia FTIR foi utilizada para determinar: 1. a eficiência da polimerização dos materiais imediatamente após a irradiação da luz; 2. o efeito da irradiação na polimerização, 20 minutos após o armazenamento dos corpos de prova em ambiente seco e escuro (Grupo D); 3. a duração da reação ácido-base nos

espécimes dos Grupos B e C posteriormente à manutenção dos mesmos por 20 minutos em ambiente seco e escuro, antes e após a fotoativação. A eficiência da polimerização imediatamente após a irradiação foi determinada na superfície externa dos espécimes no Grupo B e na superfície interna dos do Grupo C e foi determinada pela porcentagem de ligações duplas residuais de carbono, as quais totalizaram de 33-50% para os materiais estudados. Quanto maior a proporção destas ligações residuais, menor a conversão monômero/polímero do material. A irradiação após 20 minutos em ambiente seco e escuro reduziu a eficiência de polimerização de todos os materiais com exceção do Variglass, o qual não apresentou reação ácido-base. Para os outros materiais, os espécimes não irradiados após o armazenamento em ambiente seco e escuro apresentaram alta formação de sais de carboxilato quando comparados aos irradiados. Os espécimes do Vitremer não fotoativados obtiveram a maior formação dos sais de carboxilato e, uma eficiência de polimerização com aproximadamente 50% de ligações duplas residuais. A fotoativação pareceu reduzir a velocidade da reação ácido-base durante as fases iniciais da presa dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e a taxa de formação de radicais livres foi menor do que para as amostras com polimerização química inicial, mas houve adequada conversão e alta formação dos sais de carboxilato.

Gee et al.¹⁵ (1998) avaliaram o efeito do atraso e da ausência da fotoativação na estabilidade estrutural de cimentos de ionômero de vidro convencionais (CIVs) e modificados por resina (CIVMRs). Confeccionaram espécimes de CIVs (Fuji Cap II e Ketac-Fil Aplicap) e de CIVMRs (Fuji II LC Capsule, Photac-Fil Aplicap e Vitremer). Os corpos de prova confeccionados com os CIVMRs foram fotoativados aos 2 ou 60 minutos após a manipulação do material ou não foram fotoativados. Em seguida, foram submetidos ao teste de abrasão após um período de 8 horas, uma semana e quatro meses. Quando a ativação da luz foi realizada 60 minutos após a manipulação do material, a integridade estrutural nos estágios iniciais de presa do Fuji II LC e do Photac-Fil, aumentou significativamente. Por outro lado, houve uma redução da integridade do Vitremer e esta foi acentuada com a ausência da fotoativação. O Fuji II LC não foi afetado pela ausência de irradiação pela luz, enquanto que o Photac-Fil sofreu um enfraquecimento de sua estrutura. Após o período de quatro meses, a maior parte dos espécimes de cada material, os quais foram polimerizados pelos diferentes métodos, apresentou integridade estrutural semelhante entre si, com exceção das amostras de Vitremer não fotoativadas, as quais mantiveram-se enfraquecidas. Os resultados sugeriram que a integridade estrutural dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina é beneficiada com a integração química das redes de poli-alquenoato e

poli-HEMA, como ocorre com o Vitremer. Em contra-partida, a união de ambas as matrizes, como no Photac-Fil e no Fuji II LC, requer uma reação ácido-base antes da ativação da polimerização do HEMA.

Nicholson ⁴⁰ (1998) ao revisar o mecanismo de presa dos cimentos de ionômero de vidro (CIVs), observou que estes materiais consistem em uma rede de componentes orgânicos e inorgânicos que formam uma matriz, na qual partículas de vidro não reagidas são embebidas. As partículas de vidro utilizadas nos CIVs disponíveis no mercado são basicamente do tipo alumínio-silicato, contendo adicionalmente os íons cálcio e flúor. A adição do ácido tartárico à composição dos CIVs é responsável provavelmente, pela melhora das características de manipulação do material, pelo aumento do tempo de trabalho e da resistência à compressão, entretanto o mecanismo de ação deste aditivo ainda não foi bem esclarecido. A incorporação de monômeros resinosos à composição dos CIVs originou os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs), os quais apresentam uma reação de presa mais complexa. Os componentes resinosos adicionados promovem a redução da velocidade da reação ácido-base, o aumento significativo da temperatura durante a presa do material e o aumento da capacidade do mesmo de absorver água do meio externo de forma reversível. A microestrutura do cimento com a

presa completa depende da composição do material e do processo químico de presa.

Para investigar e monitorar ao longo do tempo a reação química de presa de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC) e um cimento de ionômero de vidro convencional (Fuji II Cap), Wan et al.⁴⁹ (1999) empregaram a espectroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). A reação ácido-base do Fuji II LC não foi completamente inibida pela polimerização do HEMA, entretanto foi retardada consideravelmente e continuou por mais de 96 horas após a manipulação do material. Contrariamente, a polimerização química do Fuji II Cap se completou 24 horas após a espatulação do cimento. Os resultados sugerem que a reação ácido-base dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina não é totalmente envolvida no processo de presa, o qual é iniciado pela fotoativação.

Durante a reação de presa e com o processo de solubilização dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina, ocorre a liberação de alguns de seus componentes. Inúmeros trabalhos na literatura estudaram a

natureza destes componentes e avaliaram a sua toxicidade sobre diferentes tipos celulares.

Bouillaguet et al ² (1996) determinaram a curva de dose-resposta para o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), quando em contato direto com células fibroblásticas da linhagem BALB/c no regime 3T3 *in vitro*. Testaram dez concentrações de HEMA (0,01 a 100 mmol/L) e utilizaram a solução Salina Fosfatada Tamponada (PBS) como controle negativo. Adicionaram as diferentes concentrações de HEMA ou o PBS à cultura de células BALB/c nos compartimentos de pratos plásticos e incubaram a 37°C em 5% de CO₂ e 95% de ar. Após um período de 12 e 24 horas, utilizaram o método de análise colorimétrica do Metiltetrazolium (MTT) para avaliação da atividade metabólica celular por meio da espectrofotometria. Para mensurar *in vitro* a difusão do HEMA através da dentina, utilizaram uma câmara de difusão, discos de dentina humana em espessuras de 0,5 e 1,0 mm, pressão pulpar simulada de 0 a 10 cm de água e diferentes concentrações de HEMA na parte superior da câmara (80, 150 ou 375 mmol/L). Quanto maior a concentração do HEMA e maior o tempo de exposição, maior foi a redução da atividade metabólica das células BALB/c 3T3. O HEMA se difundiu rapidamente através da dentina e este processo foi dependente da concentração aplicada,

entretanto, não foi diretamente proporcional a esta. O aumento da espessura da dentina e a presença de pressão pulpar simulada determinaram a redução do coeficiente de permeabilidade do HEMA. Os resultados indicaram que o risco a citotoxicidade aguda pelo HEMA através da dentina, é baixo, entretanto alguns fatores como a redução da espessura dentinária, a polimerização incompleta e o tempo de exposição prolongado podem contribuir para o aumento significativo deste risco.

Oliva et al.⁴¹ (1996) estudaram a resposta de células osteoblásticas humanas a cimentos de ionômero de vidro (CIVs) disponíveis no mercado. Para tal finalidade, confeccionaram espécimes de três CIVs convencionais (Ketac-Fil Aplicap, Ionocem Ionocap, Fuji II) e dois CIVs modificados por resina (Fuji II LC, Vitremer). Para a análise da manutenção do fenótipo osteoblástico, avaliaram a morfologia e a colonização celular por meio da microscopia eletrônica de varredura, a capacidade de adesão das células e a expressão da osteocalcina por meio de radio-imunoensaio com anticorpos monoclonais específicos. Todos os materiais estudados, com exceção do Vitremer, mostraram-se biocompatíveis pela presença de células viáveis aderidas aos espécimes confeccionados, proliferando e expressando marcadores bioquímicos do fenótipo osteoblástico. O alto poder citotóxico do

Vitremer às células foi avaliado por meio da análise de ressonância magnética, a qual caracterizou os efeitos adversos deste material pela liberação do HEMA e de um ácido indefinido. A adição do HEMA puro na mesma concentração liberada pelo material à cultura das células osteoblásticas resultou em morte celular total. Os resultados sugerem que novos materiais sejam formulados ou, que a composição daqueles disponíveis no mercado seja melhorada em função da compatibilidade biológica.

Schweikl e Schmalz ⁴⁵ (1996) caracterizaram a sensibilidade de três testes para avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos quimicamente diferentes. Utilizaram dois cimentos de ionômero de vidro convencionais (Ketac Fill, Aqua Cem), um cimento de fosfato de zinco (Harvard) e uma resina composta (Brilliant Lux) para avaliar dois métodos de viabilidade celular (teste do Metiltetrazolium – MTT e teste da coloração pelo vermelho neutro) e um método de proliferação celular. Para tal finalidade, utilizaram culturas de duas linhagens fibroblásticas: fibroblastos de camundongos (L-929) e fibroblastos derivados do tecido gengival humano. Na maioria dos casos, os testes de viabilidade celular identificaram respostas citotóxicas mais suaves nos fibroblastos humanos do que nas células de linhagem L-929. Os testes de viabilidade celular indicaram a alta toxicidade

dos extratos dos dois cimentos de ionômero de vidro, quando estes reagiram por 24 horas em ambiente sem umidade relativa. A citotoxicidade severa do cimento de fosfato de zinco nos dois protocolos de viabilidade celular foi menos influenciada pelas condições durante a presa. Os efeitos citotóxicos da resina composta estudada foram mais pronunciados no teste do corante vermelho neutro. Em geral, ambos os testes de viabilidade celular, MTT e vermelho neutro, foram mais sensíveis do que o teste de proliferação celular. Os resultados indicaram que estes protocolos são efetivos, rápidos, reproduzíveis e baratos. Além disso, a leitura por meio de espectrofotômetro permite a análise automática dos dados originais, sem a necessidade de equipamentos caros e sofisticados.

Kan et al.²⁵ (1997) compararam a citotoxicidade e a liberação de íons flúor de dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Vitremer-3M/ESPE, Fuji II LC-GC), um cimento de ionômero de vidro convencional (Ketac Fil-3M/ESPE) e uma resina composta (Silux Plus-3M/ESPE). Confeccionaram nove corpos de prova para cada material. Após 24 horas, estes foram imersos em água deionizada sob agitação, durante 1, 4 e 7 dias. Os extratos foram coletados em filtros esterilizados, adicionados sobre cultura de células fibroblásticas de camundongos da linhagem BALB/c, em

compartimentos de recipientes plásticos e incubados a 37°C durante 24 horas. A citotoxicidade dos materiais foi determinada pela avaliação do metabolismo celular por meio da análise colorimétrica do Metiltetrazolium (MTT) e a concentração de flúor liberado foi quantificada por um eletrodo específico, utilizando um ionizador digital. Todos os materiais apresentaram citotoxicidade mínima (menos de 30% de inibição do metabolismo celular), nos três tempos de extração. O Vitremer foi significativamente o mais citotóxico e, juntamente com o Ketac Fil, liberou maior concentração de íons flúor nos três períodos estudados (28,4; 44,1 e 53,4 ppm e, 50,9; 40 e 48,3 ppm, respectivamente). O Fuji II LC liberou 13,3; 18,9 e 20,3 ppm de flúor, enquanto a resina composta, 0,3; 0,1 e 0,4 ppm, nos dias 1, 4 e 7, respectivamente. A citotoxicidade e a liberação de flúor sugeriram que o Vitremer se comporta como um cimento de ionômero de vidro convencional e o Fuji II LC como uma resina composta.

Geurtsen et al.¹⁶ (1998) investigaram a natureza dos componentes orgânicos liberados por dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Vitrebond, Fuji II LC) e três compômeros (Compoglass, Dyract e Dyract Cem). Para tal finalidade, confeccionaram 24 corpos de prova de cada material e extraíram as substâncias em água destilada ou meio de cultura

durante 24 horas. Os extratos foram analisados por meio da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa. Identificaram monômeros (HEMA e componentes etileno glicol), aditivos (canforoquinona, cloreto de difenil-iodo) e produtos decompostos. Para a avaliação da citotoxicidade destes extratos, células da linhagem fibroblástica foram incubadas a 37°C com os componentes extraídos por 24 horas. Os extratos do Fuji II LC, do Compoglass e do Dyract inibiram moderadamente, o crescimento celular. O Vitrebond e o Dyract Cem apresentaram efeitos citotóxicos severos. O Vitrebond liberou o iniciador cloreto de difenil-iodo, enquanto que o Dyract Cem, grande quantidade do comonomero trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA). Os resultados demonstraram que ambos os extratos, cloreto de difenil-iodo e TEGDMA, podem ser considerados os principais responsáveis pelas reações citotóxicas apresentadas pelos materiais estudados e portanto, sua liberação deve ser minimizada e prevenida.

Hamid et al.¹⁸ (1998) identificaram e quantificaram os componentes liberados por seis cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Fuji Bond LC, Fuji II LC, Fuji Lining LC, Photac-Fil, Vitrebond, Vitremer) e um compômero (Dyract). Confeccionaram 3 espécimes de cada material, os quais foram mantidos em água destilada e, os extratos obtidos foram analisados por

meio de cromatografia líquida em nove períodos diferentes (4,32; 14,4; 43,2; 144 e 432 minutos e 1; 3; 10 e 30 dias). Em seguida, trinta cavidades foram preparadas em terceiros molares extraídos e uma câmara de propileno contendo 1 mL de água destilada foi adaptada à junção amelo-cementária de cada dente, para determinar a difusão dos componentes identificados através da dentina. As cavidades foram restauradas com Photac-Fil, Vitrebond ou Fuji Lining LC, os quais foram fotoativados imediatamente após a sua inserção. Apenas um componente foi detectado nos extratos obtidos dos corpos de prova, o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA). A análise da difusão do HEMA através da dentina mostrou um movimento em direção à câmara pulpar até o décimo dia, mas o fluxo foi maior no primeiro dia, reduzindo ao longo do tempo, principalmente para o Vitrebond e para o Fuji Lining LC. O HEMA foi liberado por todos os materiais estudados (cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e compômero) diretamente na água e difundido através da dentina, o que pode ser relevante para o risco de respostas pulpares adversas.

Leyhausen et al.²⁹ (1998) compararam os efeitos citotóxicos de materiais resinosos. Estudaram dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Ionoseal e Vitrebond), um compômero (Compoglass)

e um cimento de ionômero de vidro convencional (Ketac Fil Applicap). Confeccionaram espécimes de cada material, os quais foram fotoativados por 60s (Ionoseal, Vitrebond e Compoglass) ou polimerizados por 7 minutos (Ketac Fil Applicap). Extratos de cada espécime foram obtidos após duas diluições em 10 mL de meio de cultura durante 24 horas cada. A primeira foi realizada imediatamente após a polimerização dos materiais e a segunda, após 7 dias. Culturas de fibroblastos primários de gengiva inserida humana (HGF) e de fibroblastos de camundongos foram expostas aos extratos durante 48 horas. O contato direto dos corpos de prova com as culturas também foi realizado. A inibição do crescimento celular pela toxicidade do material foi determinada pela coloração das culturas com Hoechst. O Compoglass não inibiu o crescimento das duas linhagens celulares em ambos os procedimentos. O Ionoseal e o Ketac Fil Applicap inibiram suavemente ou não inibiram a proliferação das células HGF, enquanto que o Vitrebond foi responsável por alterações severas. O crescimento dos fibroblastos de camundongos foi reduzido suavemente ou moderadamente pelo Ketac Fil Applicap e pelo Ionoseal e, severamente ou totalmente pelos extratos do Vitrebond. Quando o contato direto do material foi avaliado, o Vitrebond inibiu o crescimento da cultura de fibroblastos de camundongos, contudo as células HGF não foram alteradas até o vigésimo dia. Os resultados indicaram que o CIVMR,

Vitrebond, é muito citotóxico, enquanto os outros materiais avaliados revelaram excelente (Compoglass) ou adequada (Ionoseal, Ketac Fil Applicap) compatibilidade celular.

Schedle et al.⁴⁴ (1998) avaliaram os efeitos citotóxicos de materiais dentários ativados pela luz sobre a cultura de células da linhagem fibroblástica L-929. Estudaram oito resinas compostas (Charisma, Degufill H, Z-100, Heliomolar, Tetric, Herculite XRV, Silux, Silar) que foram associadas ou não a cinco sistemas adesivos (Degufill Bond, Degufill Adhesive, Optibond Dual Cure Adhesive, Optibond Light Cure Adhesive e Optibond Prime), um compômero (Dyract-PSA), um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer/Vitremer Primer), dois cimentos de ionômero de vidro convencionais (Ketac-Cem e Fuji II), um cimento de hidróxido de cálcio (Dycal), dois cimentos de fosfato de zinco (Harvard Cement e Fleck Cement), um cimento de carboxilato (Durelon) e, um cimento resinoso (Dual Cement). Corpos de prova de cada material foram colocados em contato com as células fibroblásticas L-929 imediatamente após a confecção dos mesmos ou após a pré-incubação por 1, 2 ou 7 dias ou por 6 semanas. A contagem das células por meio da análise citométrica do fluxo celular foi realizada após a incubação dos espécimes com as células L-929 por 72 horas. Todos os materiais foram

citotóxicos às células fibroblásticas, entretanto os efeitos adversos reduziram com o aumento do período de pré-incubação e, não foram significantes após 7 dias. A combinação dos compósitos e dos sistemas adesivos mostrou-se tóxica às células mesmo após o período de pré-incubação de 7 dias, mas não após 6 semanas. O compômero (Dyract) e o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer) associados às respectivas substâncias adesivas apresentaram maiores efeitos adversos do que as resinas compostas, todavia a citotoxicidade diminuiu mais rapidamente com a pré-incubação. Os cimentos de ionômero de vidro convencionais e os cimentos de fosfato de zinco apresentaram resultados similares aos anteriores, enquanto o cimento de carboxilato mostrou efeitos severos e persistentes após 6 semanas de pré-incubação. Todos os materiais testados foram citotóxicos imediatamente após sua confecção, mas estes efeitos foram reduzidos após períodos de pré-incubação, na maioria dos casos.

Palmer et al.⁴² (1999) investigaram o efeito do tempo de fotoativação sobre a liberação do 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) em quatro cimentos de ionômero de vidro modificados por resina. Confeccionaram 6 corpos de prova para cada material experimental, Vitremer e Vitrebond (3M/ESPE), Fuji II LC e Fuji Lining LC (GC), os quais foram polimerizados pelo tempo

recomendado pelo fabricante (TRF), sub-polimerizados (0,5 TRF), sobre-polimerizados (1,5 TRF) ou polimerizados ao escuro (0 TRF). Para a maturação dos espécimes, estes foram mantidos em incubadora a 37°C durante 10 min, 40 min ou 24 h. Em seguida, foram imersos em 20 ml de água destilada a 37°C, sob agitação a cada hora, durante 4 horas. A concentração de HEMA liberada foi determinada por cromatografia líquida de alta precisão. O Vitremer, o Fuji II LC e o Fuji Lining LC tomaram presa sem a fotoativação (0 TRF) em menos de 6 min e, liberaram menores concentrações de HEMA, 1%, 7% e 4%, respectivamente. O Vitrebond não fotoativado tomou presa após 15 minutos, apresentando apenas à reação ácido-base e, a liberação de HEMA foi de 50%. A liberação de HEMA pelo Vitremer e Vitrebond, não sofreu influência da sub- ou sobre-polimerização, mas a liberação do monômero pelo Fuji II LC foi reduzida pela sobre-polimerização (1,5 TRF). A sub-polimerização (0,5 TRF) do Fuji Lining LC foi responsável por um aumento significativo na liberação de HEMA. Os tempos de maturação dos espécimes causaram pouco efeito na liberação do monômero. Os resultados obtidos indicaram que para minimizar a liberação do 2-hidroxietil metacrilato, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina devem ser fotoativados ao menos pelo tempo e na espessura recomendados pelos fabricantes.

Stanislowski et al.⁴⁷ (1999) compararam a citotoxicidade de três cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Photac-Fil applicap, Vitremer, Fuji II LC), de dois compômeros (Dyract e Compoglass), de um cimento de ionômero de vidro reforçado por metal (Hi-Dense) e de um cimento de óxido de zinco e eugenol, por meio da avaliação do metabolismo celular obtida pelo teste do dimetiltiazol difeniltetrazolium (MTT). Examinaram, também, alguns fatores que provavelmente contribuem para a citotoxicidade dos materiais: a acidificação do meio durante a presa do material, a liberação de componentes iônicos como os íons flúor, alumínio, estrôncio, zinco, prata e cobre, a liberação de monômeros resinosos e o papel da dentina na citotoxicidade. O Hi-Dense e o Vitremer foram os materiais mais tóxicos, enquanto o Compoglass e o Photac-Fil foram os menos citotóxicos. A citotoxicidade *in vitro* não foi causada por nenhuma alteração do pH dos extratos dos materiais estudados. A concentração dos íons flúor, estrôncio e alumínio, identificados nos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina, foi muito baixa para ser citotóxica, enquanto que o zinco foi o único elemento encontrado em concentração suficiente para induzir efeitos tóxicos às células. Nos extratos do CIV reforçado por metal (Hi-Dense), os íons cobre e prata estavam presentes em concentrações tóxicas. Os monômeros resinosos, HEMA e TEGDMA e o ácido poliacrílico foram

identificados nos extratos do Vitremer, do Compoglass e do Hi-Dense, respectivamente. Após a extração do HEMA do Vitremer e, do TEGDMA do Compoglass por meio de etanol, a citotoxicidade de ambos os materiais foi fortemente reduzida. A adsorção de extratos dos biomateriais estudados por pó de dentina reduziu significativamente a citotoxicidade dos mesmos. Os resultados sugerem que os monômeros resinosos não polimerizados são os principais componentes responsáveis pela toxicidade do Vitremer e do Compoglass e os íons cobre e prata, pela citotoxicidade do CIV reforçado por metais.

Lönnroth e Dahl ³⁰ (2001) avaliaram a citotoxicidade dos extratos de três cimentos de ionômero de vidro polimerizados quimicamente (Fuji II, Lining Cement e Ketac Silver) e um ativado pela luz (Fuji II LC) e quantificaram a liberação de íons potencialmente tóxicos por estes materiais. Confeccionaram corpos de prova para cada um dos materiais, sendo que aqueles confeccionados com o Fuji II LC não foram fotoativados, foram fotoativados e armazenados no meio de cultura por 24 horas ou, foram mantidos por 20 minutos em ambiente escuro, fotoativados e armazenados em meio de cultura por 24 horas para a obtenção dos extratos. Para quantificação dos componentes liberados, os corpos de prova foram colocados no interior de

tubos de ensaio e lavados sob agitação, em água a 37°C durante 24 horas (materiais quimicamente polimerizados) e 6 dias (cimento fotoativado). Em seguida, os extratos foram filtrados com filtros de miliporos esterilizados. Cerca de 15.000 células da linhagem fibroblástica (L 929) foram semeadas em 100 µl do meio de cultura α -MEM, suplementado com 5 % de soro fetal bovino, glutamina, penicilina e estreptomicina, em compartimentos de recipientes plásticos e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este tempo, realizaram a aspiração do meio e a adição de 100 µL dos extratos ou do meio de cultura (controle). A citotoxicidade foi avaliada pela análise do metabolismo celular, por meio dos testes, dimetiltiazol difeniltetrazolium (MTT) e vermelho neutro (capacidade lisossomal). A concentração de alumínio, de arsênio e de chumbo foi determinada por meio de espectrofotômetro, nos espécimes quimicamente polimerizados e fotoativados, enquanto que a concentração de flúor foi determinada apenas nos espécimes fotopolimerizados e imersos imediatamente no meio de cultura. Todos os materiais, com exceção do Ketac Silver, apresentaram citotoxicidade severa em ambos os testes, com redução de mais de 70% do metabolismo celular. Os extratos do material ativado pela luz foram mais citotóxicos do que os dos cimentos polimerizados quimicamente. O cimento de ionômero de vidro fotoativado e imediatamente imerso no meio de cultura liberou alumínio e

flúor em concentrações bem maiores do que as consideradas citotóxicas (alumínio > 0,2 ppm e flúor > 20 ppm). O cimento quimicamente ativado, Lining Cement, apresentou a maior liberação dos íons flúor e alumínio (215 ppm e 112 ppm, respectivamente), enquanto que o Ketac Silver, a menor (35,5 ppm e 13,3 ppm, respectivamente), todavia este apresentou a maior concentração de chumbo (100 ppm). Os resultados obtidos indicaram que todos os extratos dos cimentos de ionômero de vidro, polimerizados ou não pela ação da luz, contêm substâncias citotóxicas e que a fotoativação não é capaz de reduzir a toxicidade significativamente.

Chen et al.⁵ (2002) avaliaram a toxicidade de materiais odontológicos restauradores às células fibroblásticas da polpa de dentes decíduos humanos, por meio da análise da atividade das enzimas celulares, a desidrogenase succínica (SDH) e a fosfatase alcalina (ALP). Estudaram uma resina composta (Z100), um compômero (Dyract), um cimento de ionômero de vidro convencional (Fuji II) e um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC). O IRM e o meio de cultura RPMI-1640, suplementado com penicilina, estreptomicina e 20% de soro fetal bovino, foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Para a confecção dos corpos de prova foram seguidas as instruções dos respectivos fabricantes. O

Fuji II LC, a Z100 e o Dyract foram fotoativados por 40s em ambos os lados dos espécimes e o Fuji II e o IRM foram mantidos em temperatura ambiente por 15 min para a presa completa. Em seguida, os espécimes foram imersos em 1 mL de meio de cultura em temperatura ambiente durante 24 horas e os extratos foram filtrados. Cerca de 10.000 células fibroblásticas foram incubadas com 10 μ L dos extratos a 37°C durante 24 horas. A densidade óptica do SDH e da ALP foi analisada por espectrofotometria. As taxas da densidade óptica para o SDH foram: IRM < Fuji II LC < Fuji II = Z100 < Dyract < Meio e para a ALP foram: IRM < Z100 = Dyract < Fuji II < Fuji II LC < Meio. Todos os materiais testados foram citotóxicos aos fibroblastos de polpas de dentes decíduos humanos. A citotoxicidade do cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC) foi maior que a do cimento de ionômero de vidro convencional (Fuji II) e a da resina composta (Z100). O compômero (Dyract) apresentou a menor citotoxicidade. Por outro lado, a atividade da ALP do Fuji II LC foi maior que a Fuji II, enquanto que o Dyract e a Z100 apresentaram a menor atividade. Concluíram através dos resultados, que o Fuji II LC apresentou a maior citotoxicidade e a menor inibição da atividade da fosfatase alcalina e, o Dyract foi o menos citotóxico e o maior inibidor da atividade da ALP. Os resultados dos testes de MTT e da ALP não foram coincidentes.

Huang e Chang ²¹ (2002) estudaram os efeitos de materiais restauradores resinosos em células pulpares humanas. Prepararam 3 corpos de prova de cada material estudado, um compômero (Dyract), um cimento de ionômero de vidro convencional (Fuji IX), um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC) e, duas resinas compostas (Tetric e Superfil). Os extratos dos materiais foram obtidos após duas lavagens consecutivas dos espécimes em meio de cultura (DMEM) a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar, e foram esterilizados por filtração. As células pulpares humanas foram obtidas de pré-molares. Pequenos fragmentos de tecido pulpar foram mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e fungizona, à 37°C. Finalmente, as células foram extraídas com tripsina 0,25% e EDTA por 5 minutos e, subcultivadas. A citotoxicidade e a atividade de respiração mitocondrial foram avaliadas por meio do teste de MTT. Todos os materiais estudados foram tóxicos para as células pulpares humanas. A Superfil, a Tetric e o Fuji IX demonstraram efeito inibitório na atividade mitocondrial das células. A Superfil, apresentou maior citotoxicidade, enquanto que o Fuji II LC e o Dyract, foram menos citotóxicos. Os resultados indicaram que a citotoxicidade depende do material estudado, sendo que as células pulpares

reagem, inicialmente, mais favoravelmente aos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e aos compômeros.

Kawai e Takaoka ²⁷ (2002) quantificaram a liberação dos íons, flúor e hidrogênio e, do monômero resinoso HEMA por 3 cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Fuji II LC-GC, Vitremer-3M ESPE, PhotacFil Aplicap-3M ESPE) e 2 compômeros (Variglass VLC- Dentisply e Dyract-LD Caulk). Com este objetivo, confeccionaram 6 corpos de prova com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura para cada material, os quais foram fotoativados por 40 segundos. Os espécimes foram imersos em 10 ml de água destilada e incubados a 37°C durante 8 ou 24 horas. Após os respectivos tempos de incubação, os extratos foram obtidos com o auxílio de filtros de membrana e armazenados a 4°C para as análises. A concentração de HEMA liberada foi determinada por meio de cromatografia líquida e as dos íons flúor e hidrogênio pelos seus respectivos eletrodos. Em ambos os tempos de extração, 8 e 24 horas, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina liberaram grande quantidade de flúor (PhotacFil Aplicap > Vitremer = Fuji II LC > Dyract > Variglass VLC) e pequena quantidade do HEMA (Variglass VLC > Dyract > Fuji II LC > Vitremer > PhotacFil Aplicap), quando comparados aos compômeros. Não houve diferença significativa do pH dos

materiais estudados após 8 horas de incubação, entretanto, após 24 horas, o pH dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina foi maior que o dos compômeros. Os resultados sugeriram que os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina são mais interessantes do ponto de vista biológico do que os compômeros.

Costa et al.⁹ (2003) avaliaram os efeitos citotóxicos de cimentos de ionômero de vidro, convencionais e modificados por resina, em células imortalizadas de linhagem odontoblástica (MDPC-23). Para tal finalidade, confeccionaram 12 corpos de prova com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, para cada material: Vitrebond, Vitremer, Fuji II LC, Fuji IX GP, Ketac Molar e Z100 (controle positivo). No controle negativo, discos de papel filtro foram embebidos em 5 μ L de solução salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada. Os corpos de prova e os filtros de papel foram colocados no interior de compartimentos de recipientes plásticos. Em seguida, cerca de 30.000 células MDPC-23/cm² foram semeadas sobre os espécimes e incubadas por 72 horas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar, utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e glutamina. O número de células foi contado, a morfologia celular foi avaliada por meio do microscópio eletrônico de varredura e o

metabolismo celular foi verificado pela análise colorimétrica do Metiltetrazolium. Observaram uma redução do número de células pelos materiais estudados de 74,5% (Vitrebond), 75,5% (Vitremer), 45,5% (Fuji II LC), 29,5% (Fuji IX GP), 32,5% (Ketac Molar) e 88,5% (Z100). O metabolismo celular foi reduzido pelos cimentos de ionômero de vidro em 79% (Vitrebond), 84% (Vitremer), 54% (Fuji II LC), 40% (Fuji IX GP) e 42,5% (Ketac Molar). Os resultados sugeriram que embora todos os materiais experimentais tenham apresentado citotoxicidade sobre as células de linhagem odontoblástica - MDPC-23, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina apresentaram maiores efeitos citotóxicos.

Lan et al.²⁸ (2003) compararam a citotoxicidade de cimentos de ionômero de vidro convencionais (GIC FX, Hy-Bond, ProTec CEM, Fuji I, Fuji II SC, Fuji IX, GC Lining Cement) e cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Fuji II LC, Compoglass). Para tal finalidade, células pulpares humanas foram incubadas por 5 dias em contato direto com corpos de prova confeccionados com cada material. Em seguida, o teste do MTT foi realizado para a avaliação do metabolismo celular e as alterações morfológicas foram observadas e registradas por meio de microscópio eletrônico de varredura com câmara fotográfica acoplada. O ProTec CEM, o Fuji II LC, o

Compoglass e o GC Lining Cement reduziram o número de células a 11%, 12%, 19% e 25%, respectivamente, após 5 dias de incubação. Por outro lado, o Fuji IX, o GIC FX e o Fuji II SC diminuíram o número de células para 62%, 33% e 24%, respectivamente. O Hy-Bond e o Fuji I mostraram apenas uma supressão suave no crescimento das células pulpare, com redução de 12% e 16% do número de células. Morfologicamente, uma retração e um arredondamento das células foram observados após o contato das mesmas com o GC Lining Cement, enquanto que uma alteração da superfície celular foi observada após a exposição das células pulpare ao Compoglass, Fuji II LC e ProTec CEM. O Fuji II SC e o Fuji IX causaram uma redução na densidade celular, sem alterar a morfologia. Estes resultados indicaram que os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina são mais tóxicos às células pulpare que os cimentos de ionômero de vidro convencionais e, portanto, não devem ser colocados em contato direto com o tecido pulpar.

A citotoxicidade do pó e do líquido de três cimentos de ionômero de vidro convencionais (Fuji II, Lining Cement e Ketac Silver), de um CIV modificado por resina (Fuji II LC) e de dois acrilatos (Swedon e Super Bond) foi analisada por Lönnroth e Dahl ³¹ (2003). Para tal objetivo, utilizaram os testes da integridade mitocondrial (teste do MTT) e lisossomal (Teste do Vermelho

Neutro) em células fibroblásticas de ratos (L-929). Os líquidos dos cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificado por resina foram diluídos a 10% em meio de cultura suplementado com glutamina, penicilina, estreptomicina e 5% de soro fetal bovino, enquanto que os líquidos dos acrilatos foram diluídos a 1%, 0,1% e 0,01%. Extratos foram obtidos por meio da incubação do pó dos materiais testados em meio de cultura a 37°C durante 24 horas. Em seguida, 15.000 células fibroblásticas L-929 foram incubadas com 0,1 mL de cada extrato durante 24 horas. Por meio dos resultados, observaram a citotoxicidade severa dos extratos do pó do Swedon, do Fuji II e do Lining Cement. Por outro lado, os extratos do pó do Ketac Silver, do Fuji II LC e do Super Bond mostraram pouca ou nenhuma toxicidade sobre as células. A diluição a 10% dos líquidos dos materiais estudados foi severamente tóxica no teste do MTT, porém no teste do vermelho neutro apenas o Super Bond, o Fuji II e o Ketac Silver mostraram o mesmo resultado enquanto, os outros materiais apresentaram citotoxicidade moderada. As diluições dos acrilatos tiveram baixa citotoxicidade, mas o Super Bond foi severamente citotóxico mesmo quando diluído a 1%.

A biocompatibilidade dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina também foi avaliada em dentes de animais e de humanos. Felton et al.¹²

(1991) avaliaram os efeitos de um cimento de ionômero de vidro fotoativado experimental (LCGI) para forramento e um cimento quimicamente ativado (Ketac Bond). Para isso, 48 cavidades classe V foram preparadas em dentes de macacos, as quais foram aleatoriamente divididas em 6 grupos de acordo com o tratamento recebido: Grupo 1- aplicação do LCGI; Grupo 2- aplicação do Ketac Bond; Grupo 3- remoção da smear-layer e aplicação do LCGI, Grupo 4- remoção da smear-layer e aplicação do Ketac Bond; Grupo 5- exposição pulpar e capeamento com LCGI e Grupo 6- exposição pulpar e capeamento com Ketac Bond. Todas as cavidades foram restauradas com a resina composta Herculite XR. Os dentes dos grupos 1, 2, 3 e 4 foram extraídos após 7 e 35 dias e os dentes que tiveram suas polpas expostas (Grupos 5 e 6) foram extraídos após 14 dias. Em seguida, os dentes foram preparados para o exame histopatológico e para a análise em microscopia eletrônica de varredura. As respostas pulpares dos dentes capeados com ambos os materiais estudados não foram diferentes estatisticamente, em função do período de observação e da presença da smear-layer. Histopatologicamente, os resultados mostraram reação pulpar mínima para os grupos que não tiveram suas polpas expostas (grupos 1, 2, 3 e 4). Dos oito espécimes cuja polpa foi capeada com o LCGI, 3 apresentaram formação de uma nova matriz dentinária, 3 tiveram seus tecidos conjuntivos reorganizados, e apenas 2 apresentaram resposta inflamatória

crônica dos tecidos pulpaes. Nos casos, em que as polpas foram capeadas com Ketac Bond, apenas dois espécimes mostraram formação de ponte de dentina. A análise da microscopia eletrônica de varredura demonstrou forte adesão do LCGI às paredes das cavidades, com ausência de formação de fendas. Os resultados indicaram que o cimento de ionômero de vidro fotoativado experimental para forramento não impediu o processo de reparação pulpar quando colocado em cavidades profundas e, ambos os cimentos estudados apresentaram excelentes respostas pulpaes.

Gaintantzopoulou et al.¹⁴ (1994) compararam as respostas pulpaes de dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento (Vitrebond, XR Ionomer) com um cimento de ionômero de vidro convencional (Lining Cement) e, com o cimento de óxido de zinco e eugenol (controle). Confeccionaram 96 cavidades classe V profundas nas superfícies vestibulares de dentes de três cães adultos jovens, deixando a camada de smear layer intacta. As cavidades foram forradas aleatoriamente com os materiais estudados e, restauradas com resina composta (Silux Plus). Após o sacrifício dos animais aos 7, 30 ou 90 dias, as mandíbulas foram removidas, fixadas em formalina a 10% e, descalcificadas em ácido fórmico a 5%. Em seguida, os dentes foram seccionados em espessuras de 7 μ m e corados com

Hematoxilina e Eosina. Alguns cortes foram corados pelo método de Brown e Brenn para verificação da presença de bactérias. A análise microscópica indicou que as reações pulpareas ao Vitrebond e ao XR Ionomer foram mínimas e comparáveis ao Lining Cement e controle. A presença de bactérias foi observada em nove espécimes, sendo que apenas um deles revelou reação pulpar moderada. Os resultados indicaram que os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento testados são bem tolerados pelos tecidos pulpareas de cães.

Tarim et al.⁴⁸ (1998) estudaram a resposta pulpar de dentes de macacos a um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, Vitremer (3M/ESPE). Confeccionaram 144 cavidades classe V em dentes de macacos adultos, os quais tiveram suas polpas expostas ou não e capeadas com o Vitremer. O cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE) foi utilizado como controle nos casos em que o tecido pulpar não foi exposto e o hidróxido de cálcio (HC), quando as polpas foram expostas. Os dentes foram extraídos aos 6, 7, 21, 27, 90 e 97 dias após a realização dos procedimentos. Em seguida ao processamento histológico, o tecido pulpar foi analisado em microscopia de luz. Não houve diferença entre as respostas das polpas não expostas quando estas foram capeadas com o Vitremer ou com o Óxido de zinco e eugenol

(controle). Por outro lado, nas polpas expostas, 8 dos 36 dentes capeados com Vitremer mostraram graus diferentes de resposta inflamatória, os quais foram associados à presença de bactérias. O processo de cura do tecido pulpar capeado com o Vitremer e com o Hidróxido de Cálcio foi semelhante. Nas polpas expostas capeadas com o Vitremer, foi observada a reorganização do tecido, bem como a formação de ponte dentinária aos 21 e 97 dias. Os resultados sugeriram que o cimento de ionômero de vidro modificado por resina exibiu compatibilidade biológica em cavidades sem e com exposição pulpar, em dentes de macacos.

Nascimento et al.³⁹ (2000) avaliaram a resposta pulpar de dentes humanos após capeamento direto com um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) ou com um cimento de hidróxido de cálcio (Dycal). Dentes hígidos foram utilizados como controle. Cavidades classe V foram preparadas em 34 pré-molares humanos, nos quais o tecido pulpar foi exposto e capeado com os materiais experimentais. Em seguida, as cavidades foram restauradas utilizando o adesivo dentinário Clearfil Liner Bond II e a resina composta Z100. Os dentes foram extraídos após 5, 30, 120 e 300 dias, fixados em solução de formol tamponado a 10% e, submetidos ao processamento histológico. No quinto dia, o cimento de hidróxido de cálcio

(HC) produziu uma grande zona de necrose de coagulação e sob a mesma, uma reação inflamatória mononuclear de intensidade suave à moderada. O Vitrebond (VB) causou uma resposta pulpar inflamatória de intensidade moderada e a formação de uma zona de necrose extensa. Vasos obliterados associados com extravasamento plasmático e infiltração neutrofílica foram observados. Ao longo do tempo, apenas o HC permitiu o reparo pulpar e a formação completa de ponte de dentina ao redor do local da exposição pulpar. Os componentes liberados pelo VB no interior da polpa dentária desencadearam uma reação inflamatória persistente, a qual foi associada com a ausência de formação da ponte dentinária. Após 30 dias, poucos cortes histológicos mostraram a presença de bactérias nas paredes dentinárias. Nestas amostras, a resposta pulpar foi semelhante às aquelas com ausência de microinfiltração. O Vitrebond foi mais irritante ao tecido pulpar do que o Dycal, o qual permitiu o reparo pulpar e a formação de ponte de dentina. Estes resultados indicaram que o Vitrebond não é um material apropriado para o capeamento pulpar direto de polpas humanas expostas.

Costa et al.⁷ (2003) avaliaram a resposta do complexo dentino-pulpar de dentes humanos após a aplicação de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) ou um sistema adesivo (One Step) em

cavidades profundas. Prepararam cavidades classe V nas superfícies vestibulares de 26 pré-molares. No grupo 1, as paredes das cavidades foram condicionadas com ácido fosfórico a 32% e o sistema adesivo dentinário (One Step) foi aplicado. Nos grupos 2 e 3, antes do condicionamento ácido, as cavidades foram forradas com o Vitrebond ou com Dycal (cimento de hidróxido de cálcio), respectivamente. Todas as cavidades foram restauradas com a resina composta Z100. Os dentes foram extraídos nos períodos pós-operatórios de 5 e 30 dias e foram preparados para a análise microscópica. Secções seriadas foram coradas com H/E e pelas técnicas do Tricrômico de Masson e Brown e Brenn. No Grupo 1, a resposta inflamatória foi mais evidente que nos Grupos 2 e 3. A difusão de componentes do material através dos túbulos dentinários foi observada apenas no Grupo 1, no qual a intensidade da resposta pulpar aumentou com a redução da espessura da dentina remanescente. A presença de bactérias foi evidente nas paredes laterais de duas amostras do Grupo 2, o qual não exibiu resposta inflamatória ou desorganização tecidual. Baseado nos resultados, concluíram que a aplicação do sistema adesivo One Step não é recomendada diretamente sobre a dentina em cavidades profundas. Nestes casos, as paredes das cavidades devem ser forradas com um material mais biocompatível como o Vitrebond ou o Dycal.

Costa et al.⁸ (2003) compararam as respostas de polpas de dentes de ratos capeadas com um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond) e um adesivo dentinário (Clearfil Liner Bond 2V). Confeccionaram cavidades classe I nas superfícies oclusais de 54 primeiros molares superiores de ratos. O tecido pulpar foi exposto mecanicamente e capeado com: Clearfil Liner Bond 2V (CLB), Vitrebond (VB) ou com pasta de hidróxido de cálcio (HC), como controle. Em seguida, as cavidades foram restauradas com amálgama. Após 7, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e os dentes foram processados para análise microscópica. Aos 7 dias, uma resposta inflamatória com necrose parcial do tecido foi observada para os materiais experimentais e para o controle. A reparação pulpar foi associada à formação de barreira mineralizada após 60 dias da terapia pulpar. Ambos os materiais resinosos promoveram a deposição de fibrodentina rica em células no local da exposição pulpar, a qual foi mais extensa para as amostras do VB. Houve, também, a formação de dentina terciária depositada por células pulpares alongadas sob a camada da matriz de fibrodentina. O tecido pulpar remanescente exibiu características histológicas de normalidade. No grupo controle, a reparação e a formação de ponte de dentina foram observadas após 30 dias. A desorganização do tecido pulpar ocorreu apenas na presença de bactérias. Os resultados indicam que ambos os agentes capeadores

(Vitrebond e Clearfil Liner Bond 2V) permitiram a reparação pulpar que foi caracterizada pela formação de fibrodentina rica em células e pela deposição de dentina terciária, formando a ponte dentinária.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina, para forramento, sobre células imortalizadas de linhagem odontoblástica – MDPC-23, quando submetidos a diferentes tempos de fotoativação.

MATERIAL E MÉTODO

A. Cultivo das células MDPC-23

Para a avaliação da citotoxicidade dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR), foram utilizadas células imortalizadas da linhagem odontoblástica - MDPC-23²⁰.

As células foram semeadas em frascos de cultura esterilizados com 75 cm² de área (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), utilizando o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM/L de glutamina e foram cultivadas em estufa com 100% de umidade a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar²⁰.

As células foram subcultivadas a cada três dias em quantidade de 3×10^4 células MDPC-23 por centímetro quadrado (regime 3T6), até se obter o número de células adequado (6×10^6 células) para a execução do experimento, o qual foi realizado na passagem 59.

B. Confeção dos corpos de prova

Neste estudo foram avaliados dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento (Vitrebond – 3M/ESPE e Fuji Lining LC-GC). Como controle positivo foi utilizado o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA puro) e para o controle negativo, a solução salina fosfatada tamponada (PBS), pH 7,4.

A composição, o fabricante, a proporção pó/líquido (em peso), o tempo de fotoativação recomendado pelo fabricante (TRF), bem como os lotes dos materiais utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Para o preparo e a padronização dos corpos de prova, foram utilizadas matrizes bipartidas de aço inoxidável, medindo 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, confeccionadas pela Incombi (Indústria e Comércio de Máquinas BIAGIONI Ltda, Araraquara, Br) (Figuras 1a e 1b).

Tabela 1. Apresentação dos materiais

Nome Comercial (Fabricante)	Composição (porcentagem em peso)	Proporção Pó/Líquido em peso	ΓRF	Lote
Vitrebond 3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA	Pó: pó de vidro (SiO ₂ , AlF ₃ , ZnO, SrO, criolite, NH ₄ F, MgO, P ₂ O ₅) ->95%; cloreto de difenil-iodo - <2% Líquido: ácido poliacrílico modificado- 35-45%; 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) - 20-30%; água – 30-40%	1,4:1	30s	20030110
Fuji Lining LC GC, Tokyo, Japan	Pó: alumino-silicato de vidro – 100% Líquido: ácido poliacrílico – 65-70% 2-hidroxietil metacrilato – 8-10%	1,4: 1	30s	0206041
HEMA SIGMA-Chemical Co., St. Louis, USA	2-hidroxietil metacrilato (98%)	----	----	----
PBS	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na ₂ HPO ₄ , 0,24g KH ₂ PO ₄ 1L de água ultra-pura	----	----	----

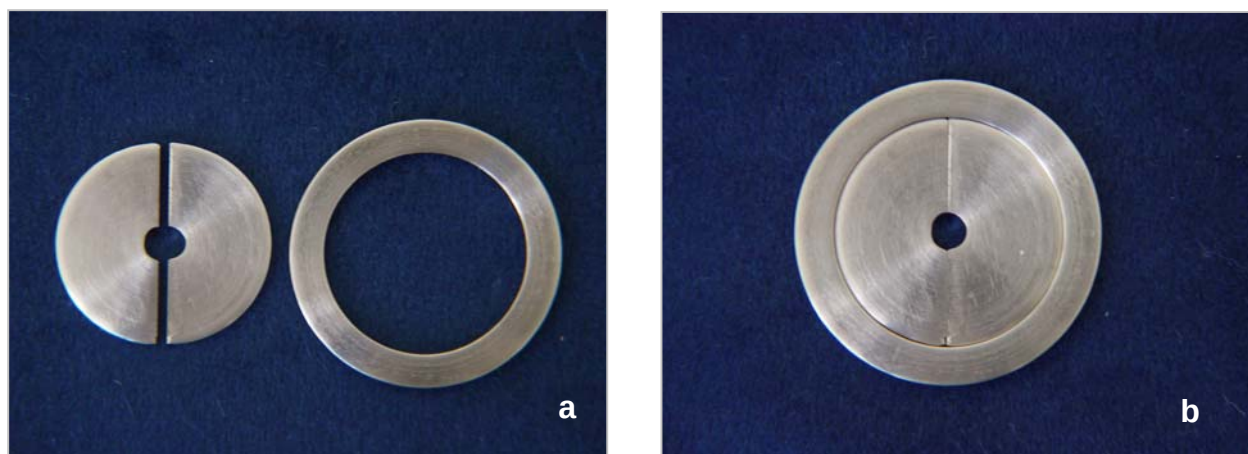


Figura 1 (a, b). Matriz bipartida de aço inoxidável com 4mm de diâmetro e 2mm de espessura.

Os materiais experimentais foram manipulados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes, na proporção pó/líquido recomendada (em peso), utilizando-se bloco de papel e espátula esterilizados (Figura 2a).

Para a calibração do operador com relação à proporção pó/líquido, foi realizada a pesagem de dez medidas do pó e dez gotas do líquido (Apêndice 1), procurando minimizar a possibilidade de variação. A mesma colher e o mesmo pingador usados para as pesagens foram utilizados durante todo o experimento.

Sobre uma placa de vidro, foi posicionada uma tira matriz de poliéster para impedir a adesão do material e, sobre esta, a matriz de aço inoxidável, que foi preenchida com o material preparado, com o auxílio de seringa Centrix (Centrix incorporated, Connecticut, USA) (Figura 2b).

Sobre a matriz preenchida com o material, foi colocada outra tira matriz de poliéster e uma lâmina de vidro de um milímetro de espessura para reduzir a formação da camada não fotoativada pela presença de oxigênio (Figura 2c).

Um anel de metal adaptado para a inserção da ponta do fotopolimerizador foi posicionado sobre a lâmina de vidro e, sobre este, foi colocado um peso de 500g para eliminar o excesso de material e evitar a inclusão de bolhas de ar no corpo de prova (Figura 2d).

Quatro diferentes tempos de fotoativação foram avaliados: ausência de fotoativação (T0), metade do tempo recomendado pelo fabricante (T1), tempo recomendado pelo fabricante (T2) e uma vez e meia o tempo recomendado pelo fabricante (T3), correspondendo a 0s, 15s, 30s e 45s, respectivamente

Para a fotoativação foi utilizado aparelho com intensidade de luz dentro de uma variação de 400 mW/cm^2 a 530 mW/cm^2 , monitorada por radiômetro (Optilux 500, Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA) ⁴³, posicionado a um milímetro da superfície do corpo de prova, diretamente sobre a lâmina de vidro (Figura 2d).

Os corpos de prova que não foram fotoativados, após a inserção do material na matriz de aço inoxidável e a proteção com uma matriz de poliéster, uma lâmina de vidro e o peso, foram colocados em estufa com 100% de umidade a 37°C , onde permaneceram por 15 minutos.

Após a fotoativação ou decorridos os 15 minutos para a polimerização na ausência de luz, todos os corpos de prova foram retirados da matriz (Figuras 2e e 2f). Em seguida, foram levados à capela de fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12 – Veco) e lavados sob agitação com 1mL de PBS e com 1mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 5 minutos cada lavagem, com a finalidade de remover qualquer resíduo presente na superfície dos mesmos.

Para cada um dos grupos controle, positivo e negativo, 10 discos de papel filtro (Matheson Scientific Inc., E&D 613, MI, USA) com 4 mm de diâmetro foram autoclavados a 120°C durante 15 minutos.

Cada disco de papel filtro do grupo controle negativo recebeu 5 µL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada, e do grupo controle positivo, 5 µL de HEMA puro.

O número de espécimes e a identificação de cada grupo estão apresentados na Tabela 2.

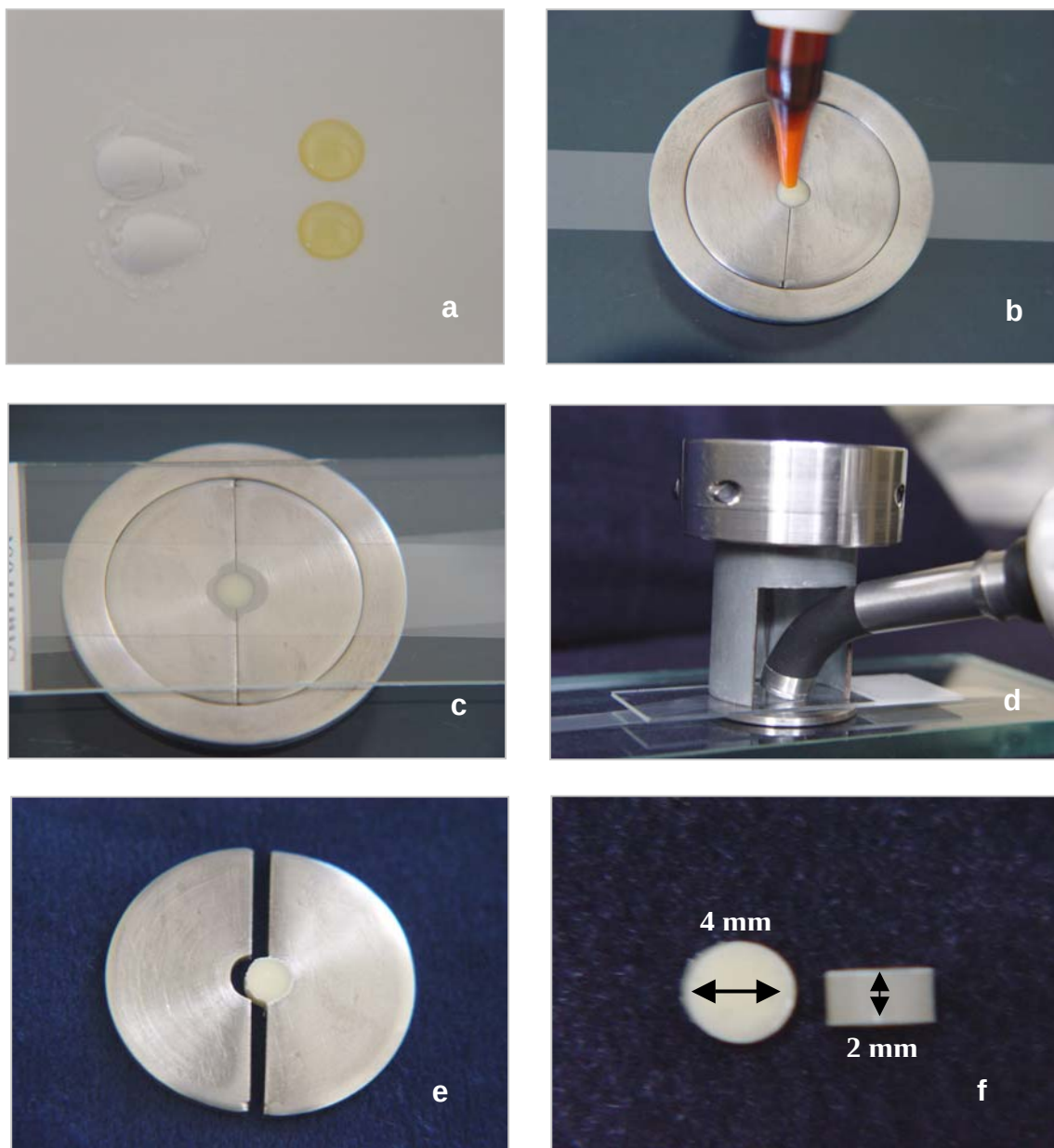


Figura 2 - Confeção dos corpos de prova (a - proporcionamento do material; b - introdução do material na matriz de aço inoxidável; c - posicionamento da tira matriz de poliéster e da lâmina de vidro sobre a matriz de aço inoxidável; d - posicionamento do anel de metal, peso e fotopolimerizador; e - remoção do corpo de prova da matriz bipartida; f - caracterização dos corpos de prova)

Tabela 2. Apresentação do número de espécimes e identificação dos grupos, segundo as variáveis, material e tempo de fotoativação.

Material	Tempo de Fotoativação				TOTAL
	0TRF T0	0,5TRF T1	TRF T2	1,5TRF T3	
Vitrebond (VB)	10	10	10	10	40
Identificação do grupo	VB0	VB1	VB2	VB3	
Fuji Lining LC	10	10	10	10	40
Identificação do grupo	FL0	FL1	FL2	FL3	
HEMA	10	---	---	---	10
	---	---	---	---	
PBS	10	---	---	---	10
	---	---	---	---	
TOTAL	40	20	20	20	100

C. Avaliação da citotoxicidade

Para a análise da citotoxicidade foram avaliadas a atividade metabólica e a morfologia celular.

1. *Atividade metabólica celular*

Para a análise da atividade metabólica celular, foram avaliados oito corpos de prova de cada grupo por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Para atingir este objetivo, foi utilizada a análise colorimétrica do Metiltetrazolium (teste do MTT) ³⁷.

Em capela de fluxo laminar vertical os espécimes foram posicionados na região central do fundo de compartimentos de recipientes plásticos para cultura de células com 24 compartimentos de 1,98 cm² de área cada (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Em seguida, estes foram fixados com grampos esterilizados, confeccionados com fio ortodôntico 0,5 mm (Figuras 3 a-c).

Finalmente, 1 mL do meio de cultura DMEM suplementado, contendo cerca de 3×10^4 células imortalizadas de linhagem odontoblástica - MDPC-23 por centímetro quadrado, foi introduzido em cada compartimento dos recipientes

plásticos (Figura 3d), os quais foram mantidos por 72 horas em estufa com 100% de umidade à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar.

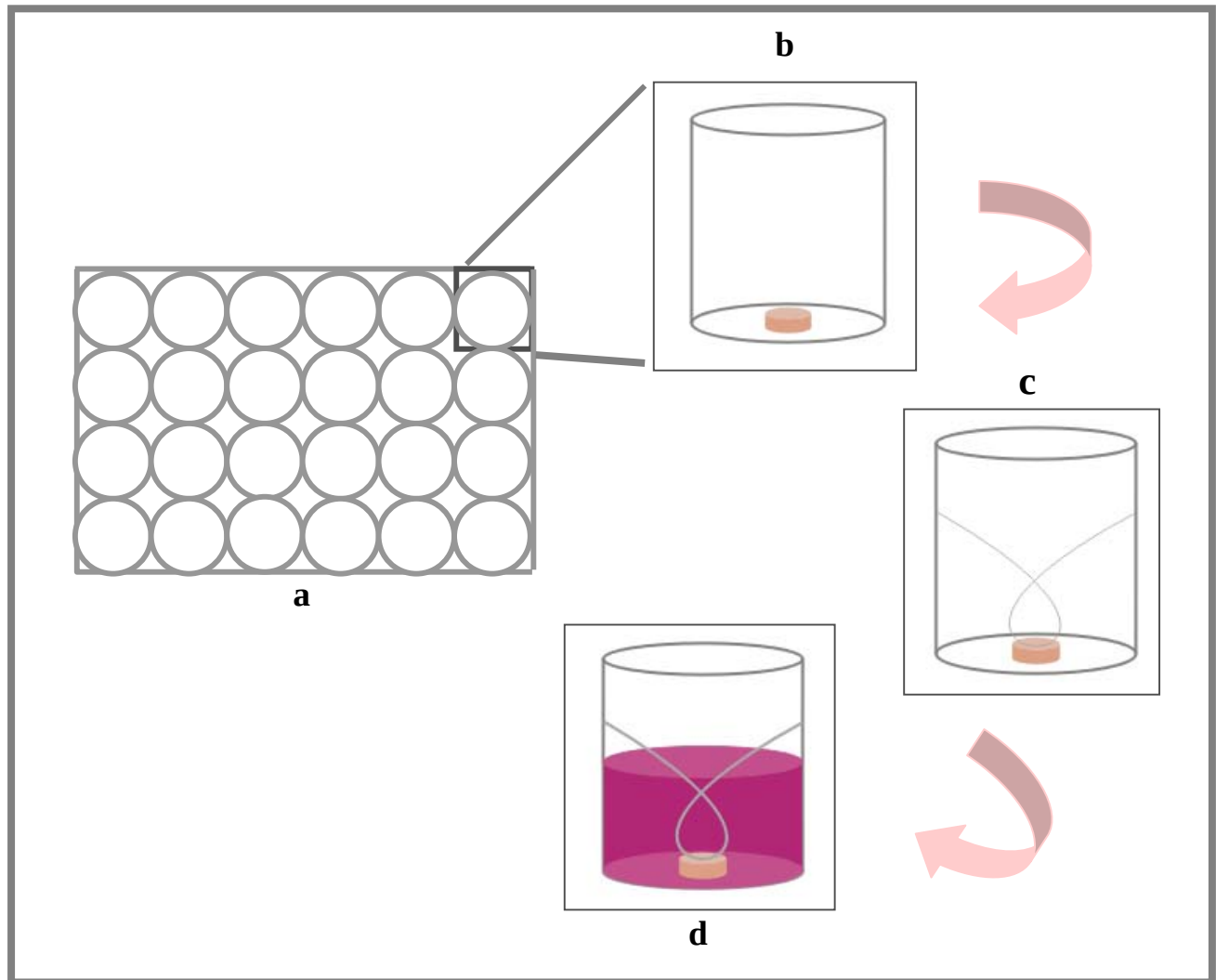


Figura 3- Preparo para a avaliação do metabolismo celular (a – recipiente plástico com 24 compartimentos; b - posicionamento do corpo de prova no interior do compartimento; c - fixação do corpo de prova no compartimento com grampo de fio ortodôntico 0,5 mm; d - introdução no compartimento de 3×10^4 células MDPC-23/cm² em meio DMEM suplementado).

Novamente em capela de fluxo laminar vertical, os grampos e os corpos de prova foram removidos e o meio de cultura de cada compartimento dos recipientes plásticos foi substituído por 900µL de meio de cultura DMEM, ao qual foi adicionado 100µL de solução de MTT (Sigma Chemical Co., USA) numa concentração de 5mg/mL de PBS, com a finalidade de identificar as células viáveis pela clivagem dos anéis de tetrazolium. As células foram incubadas por mais 4 horas a 37°C (Figura 4a). Em seguida, o meio de cultura foi removido e cada compartimento recebeu 600 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04N para solubilizar os cristais formados pela degradação dos anéis de tetrazolium. A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal são coradas em violeta intenso (Figura 4b).

A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIO-TEK Instruments, ICC), num comprimento de onda de 570nm (Figura 4c).

Para tal finalidade, cinco alíquotas de 100µL de cada compartimento foram removidas e colocadas em um outro recipiente plástico com 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) (Figura 4d).

Para a padronização da leitura, os dois compartimentos iniciais dos recipientes foram preenchidos com 100µL da solução de isopropanol acidificado em HCl a

0,04N, para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular. Os resultados foram obtidos por meio da média em valores numéricos das cinco alíquotas de cada compartimento.

Em seguida, calculou-se, em porcentagem, o efeito inibitório dos diferentes grupos estudados sobre a atividade mitocondrial das células.

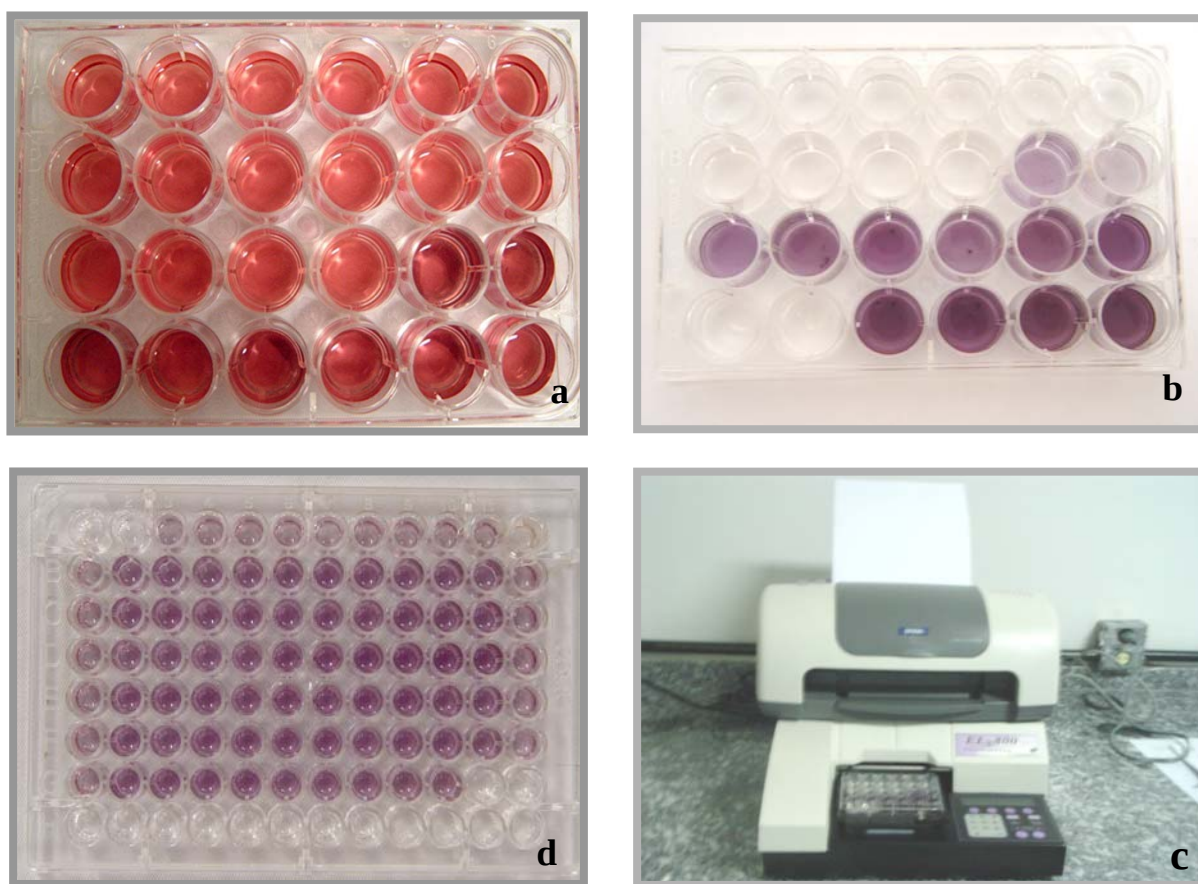


Figura 4. Avaliação do metabolismo celular (a - aspecto após 4 horas de incubação com a solução de MTT; b - coloração após adição do isopropanol em HCl a 0,04 N; c - Leitor Universal de ELISA; d – Cinco alíquotas de 100µL de cada compartimento para leitura no espectrofotômetro).

2. Análise da morfologia celular

Dois espécimes de cada grupo experimental e dos grupos controle foram preparados para análise da morfologia celular por meio da microscopia eletrônica de varredura-MEV (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope).

Lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) foram lavadas em solução salina fosfatada tamponada (PBS - pH 7,4) e esterilizadas quimicamente em etanol a 70% por no mínimo 6 horas. Em seguida, em capela de fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12 – Veco), foram lavadas em PBS, por três vezes sob agitação constante, durante 15 minutos cada lavagem para remoção dos resíduos da solução de etanol. Estas lamínulas foram posicionadas no fundo dos compartimentos de recipientes plásticos para cultura de células (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) (Figura 5a).

Os corpos de prova (grupos experimentais) e os discos de papel filtro (grupos controle positivo e negativo) foram posicionados sobre o centro dessas lamínulas e fixados com grampos esterilizados confeccionados com fio ortodôntico 0,5 mm (Figuras 5b e 5c). Em seguida, em cada compartimento dos recipientes plásticos foi introduzido 1 mL do meio de cultura DMEM suplementado, contendo cerca de 3×10^4 células da linhagem MDPC-23 por centímetro quadrado (Figura 5d).

Os recipientes foram mantidos por 72 horas em estufa com 100% de umidade a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Decorrido este período, os grampos, os corpos

de prova e o meio de cultura, foram removidos e as células aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas por 24 horas em glutaraldeído 2,5% (1 mL por compartimento). Sequencialmente, as células foram:

- a. Lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
- b. Pós-fixadas em 200 μ L de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos.
- c. Lavadas por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem).
- d. Lavadas por duas vezes com 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem).
- e. Desidratadas em 1 mL de solução de etanol 30%, 50% e 70%, 2 x 95% e 2 x 100% (30 minutos em cada solução).
- f. Lavadas por três vezes com 200 μ L de HMDS (Hexametil-disiloxano - SIGMA), 20 minutos cada lavagem, o qual auxilia na secagem das células por ser um solvente de baixa tensão superficial.

Finalmente, a solução de HMDS foi desprezada e os recipientes foram tampados e mantidos por 12 horas no dessecador.

Decorrido este tempo, as lamínulas contendo as amostras foram removidas do fundo dos compartimentos dos recipientes plásticos por meio de pinça cirúrgica, fixadas em *stubs*, metalizadas e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope) para determinação da morfologia celular.

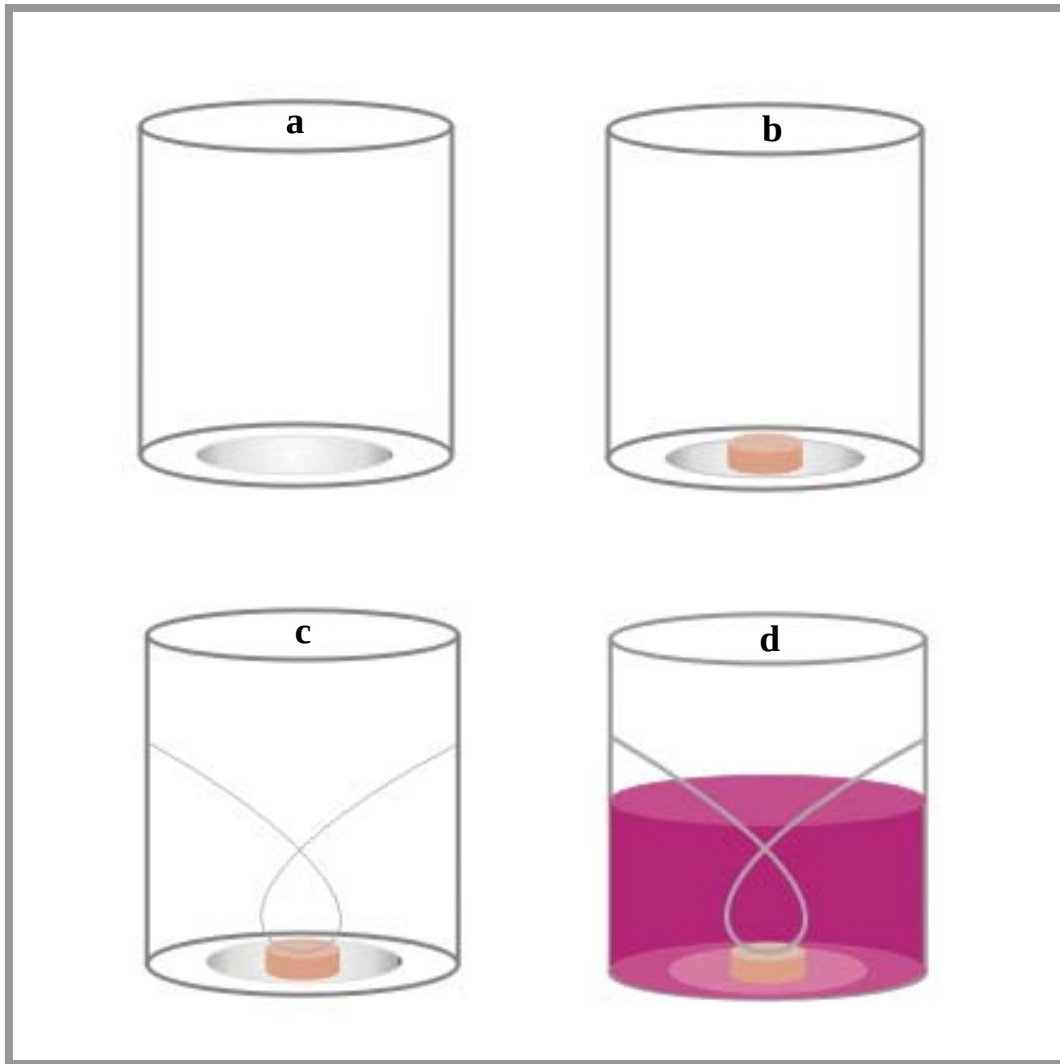


Figura 5- Preparo para a análise da morfologia celular (a - posicionamento da lamínula de vidro no centro do compartimento do recipiente plástico para cultura de células; b - posicionamento do corpo de prova sobre a lamínula; c - fixação do corpo de prova com grampo de fio ortodôntico 0,5 mm; d - introdução no compartimento de 3×10^4 células MDPC-23/cm² em meio DMEM suplementado).

D. Tratamento estatístico dos resultados

Neste estudo, material e tempo de fotoativação foram considerados variáveis independentes, influenciando ou não a atividade metabólica celular, considerado como variável dependente.

A variável independente material apresentou quatro níveis, dois cimentos de ionômero de vidro para forramento (Vitrebond e Fuji Lining LC), um monômero resinoso (HEMA) e, a solução salina tamponada fosfatada (PBS). A variável tempo de fotoativação também apresentou quatro níveis: ausência de fotoativação (0 TRF), metade do tempo recomendado pelo fabricante (0,5 TRF), tempo recomendado pelo fabricante (TRF), que foi considerado o controle para esta variável, e uma vez e meia o tempo recomendado pelo fabricante (1,5 TRF). Assim, de acordo com a proposição deste trabalho, as hipóteses testadas foram:

1. Quanto ao material

H_0 : o material não exerce influência na atividade metabólica celular;

H_1 : o material exerce influência na atividade metabólica celular.

2. Quanto ao tempo de fotoativação

H_0 : o tempo de fotoativação não exerce influência na atividade metabólica celular;

H_1 : o tempo de fotoativação exerce influência na atividade metabólica celular.

3. Quanto à interação material/ tempo de fotoativação

H_0 : a interação material/ tempo de fotoativação não exerce influência na atividade metabólica celular ;

H_1 : a interação material/ tempo de fotoativação exerce influência na atividade metabólica celular.

Como a análise do metabolismo celular forneceu dados contínuos em distribuição não-normal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação dos grupos.

Os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) e quando foi rejeitada a hipótese nula, foram realizados os testes de Mann-Whitney para a identificação das diferenças.

A análise da morfologia celular foi realizada de forma descritiva.

RESULTADOS

1. Metabolismo celular (MTT)

Os dados obtidos pela técnica colorimétrica do Metiltetrazolium (teste do MTT) ³⁷ estão apresentados no Apêndice 2 e a análise descritiva nas Tabelas 3 e 4.

A dispersão dos dados foi analisada por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$), o qual constatou a distribuição não normal dos mesmos (Tabela 5). Por essa razão selecionou-se, o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise das variáveis material e tempo de fotoativação (Tabela 6).

Tabela 3. Análise descritiva dos dados referentes ao metabolismo celular (MTT), considerando a variável material.

Material	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Coef. de variação
Vitrebond (VB)	32	0,064	0,062	0,044	0,116	0,019	29,7%
Fuji Lining LC (FL)	32	0,301	0,295	0,140	0,453	0,101	33,5%
HEMA	8	0,055	0,052	0,049	0,070	0,007	12,7%
PBS	8	0,332	0,335	0,240	0,420	0,064	19,3%

Tabela 4. Análise descritiva dos dados referentes ao metabolismo celular, considerando a interação material/tempo de fotoativação.

Grupo experimental	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão	Coef. de variação
VB0	8	0,056	0,052	0,047	0,072	0,009	16,0%
VB1	8	0,064	0,059	0,044	0,095	0,019	29,7%
VB2	8	0,069	0,073	0,044	0,110	0,024	34,8%
VB3	8	0,068	0,067	0,045	0,116	0,023	33,8%
FL0	8	0,189	0,173	0,140	0,286	0,049	25,9%
FL1	8	0,313	0,321	0,182	0,453	0,103	32,9%
FL2	8	0,370	0,384	0,286	0,436	0,059	15,9%
FL3	8	0,331	0,358	0,213	0,444	0,087	26,3%

Tabela 5. Teste de normalidade para a variável metabolismo celular (MTT).

Kolmogorov-Smirnov		
Estatística	Grau de Liberdade	Grau de Significância
0,215	80	0,000*

* Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

Tabela 6. Teste de Kruskal-Wallis para o metabolismo celular (MTT).

Variáveis Independentes	Grau de Liberdade	Qui-Quadrado	Grau de Significância
Material	3	59,569	0,000*
Tempo de Fotoativação	3	2,984	0,394

* Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$)

Uma vez que o teste de Kruskal-Wallis demonstrou existir diferença entre os materiais estudados, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test) para localizar as diferenças, considerando os grupos dois a dois. Os resultados deste teste estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 6, mostrando que os grupos Vitrebond e HEMA e os grupos Fuji Lining LC e PBS apresentaram médias estatisticamente semelhantes.

Tabela 7. Teste de Mann-Whitney para as comparações múltiplas, segundo a variável material.

Comparações	Mann-Whitney	Significância
VB X FL	0,000	0,000*
VB X HEMA	424,000	0,236
VB X PBS	0,000	0,000*
FL X HEMA	0,000	0,000*
FL X PBS	422,000	0,226
HEMA X PBS	0,000	0,000*

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

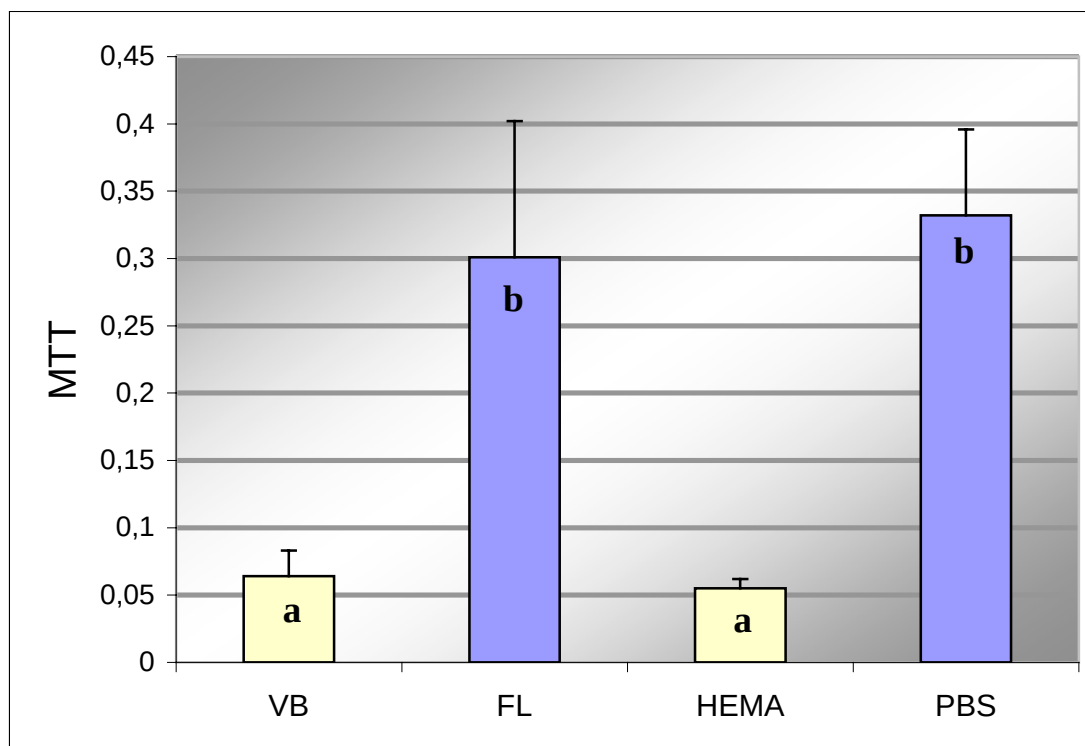


Figura 6. Representação gráfica das médias referentes ao metabolismo celular (MTT) segundo os materiais estudados (Letras iguais representam grupos estatisticamente semelhantes de acordo com o Teste de Mann-Whitney).

O teste de Kruskal-Wallis aplicado aos dados referentes aos materiais experimentais (VB, FL) não identificou diferença estatisticamente significativa entre os tempos de fotoativação. Todavia, quando foi aplicado o mesmo teste para avaliar a influência do tempo de fotoativação para cada um dos dois materiais, separadamente, observou-se que apenas o Fuji Lining LC apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 8). O teste de Mann-Whitney foi realizado para localizar as diferenças, considerando os tempos de fotoativação dois a dois, sendo observado que apenas o tempo T0 (0 TRF) foi estatisticamente diferente aos demais tempos estudados (Tabela 9).

O teste de Mann-Whitney também foi aplicado para comparar os materiais, Vitrebond e Fuji Lining LC, em cada um dos tempos de fotoativação estudados, mostrando diferença estatisticamente significativa entre estes materiais nos quatro tempos de fotoativação (Tabela 10).

Considerando a atividade metabólica celular do grupo controle negativo (PBS) equivalente a 100%, foram calculadas as taxas referentes aos demais materiais. A redução do metabolismo celular foi obtida pela equação: $100\% - \text{taxa de atividade metabólica celular dos diferentes materiais estudados}$ e de acordo com a interação material/tempo de fotoativação e está representada graficamente nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Tabela 8. Teste de Kruskal-Wallis para a variável tempo de fotoativação segundo o material.

Material		MTT
VB	Qui-Quadrado	1,281
	Grau de Liberdade	3
	Grau de significância	0,734
FL	Qui-Quadrado	14,369
	Grau de Liberdade	3
	Grau de significância	0,002*

* Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Tabela 9. Teste de Mann-Whitney para comparação entre os tempos de fotoativação para o material Fuji Lining LC.

Comparações	Mann-Whitney	Grau de Significância
T0 X T1	8,000	0,010*
T0 X T2	0,500	0,000*
T0 X T3	5,000	0,003*
T1 X T2	19,000	0,195
T1 X T3	29,000	0,798
T2 X T3	24,000	0,442

* Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

Tabela 10. Teste de Mann-Whitney para comparação entre os materiais experimentais, Fuji Lining LC e Vitrebond, segundo o tempo de fotoativação.

Tempo de Fotoativação	Mann-Whitney	Grau de Significância
0TRF	0,000	0,001*
0,5TRF	0,000	0,001*
TRF	0,000	0,001*
1,5TRF	0,000	0,001*

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

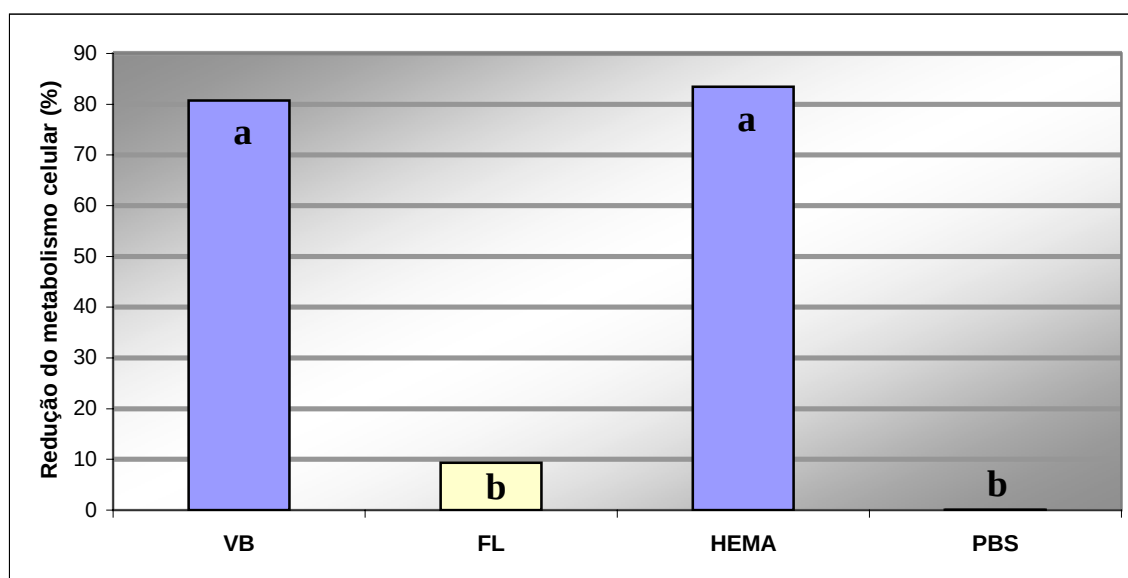


Figura 7. Representação gráfica da redução do metabolismo celular, em porcentagem, de acordo com os materiais estudados (Letras iguais representam grupos estatisticamente semelhantes de acordo com o Teste de Mann-Whitney).

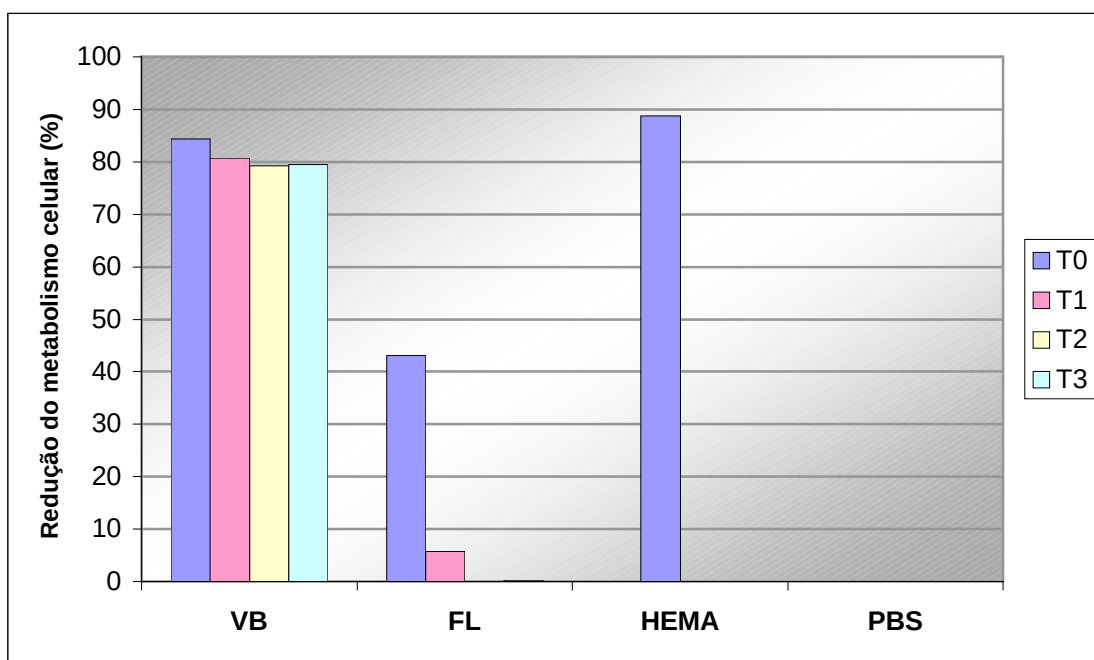


Figura 8. Representação gráfica da redução do metabolismo celular, em porcentagem, de acordo com os materiais e os tempos de fotoativação estudados.

2. *Análise da Morfologia Celular em Microscopia Eletrônica de Varredura*

Grupo controle negativo (PBS)

Grande número de células MDPC-23 organizadas em nódulos densos foram observadas aderidas à lamínula de vidro. Estas células se apresentavam com morfologia alongada e múltiplos prolongamentos citoplasmáticos finos e longos, originados de sua membrana (Figura 9). Estes prolongamentos citoplasmáticos pareciam aderir as células MDPC-23 ao substrato de vidro.

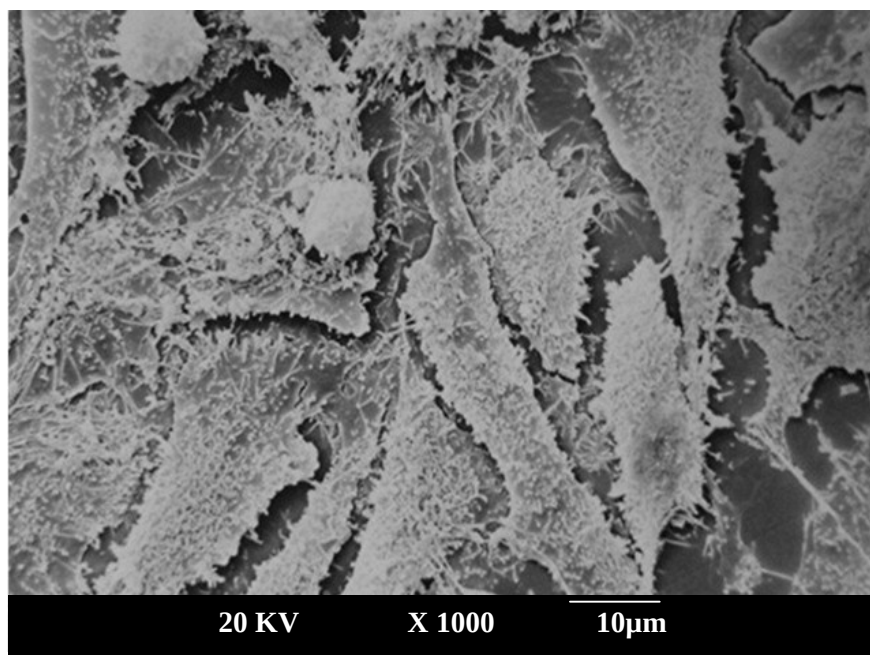


Figura 9. Grupo controle negativo (PBS) - Presença de células alongadas organizadas em nódulos densos.

Grupo controle positivo (HEMA)

Neste grupo, um número reduzido de células MDPC-23 permaneceu aderido à lamínula de vidro. A forma arredondada foi a característica morfológica predominante para a maioria destas células, as quais exibiam tamanho reduzido e prolongamentos citoplasmáticos praticamente ausentes (Figura 10a). Em algumas situações, as células pareciam estar em processo de morte com rompimento da membrana citoplasmática (Figura 10b).

Pequenas estruturas sugestivas de restos de componentes celulares degradados permaneceram aderidas ao substrato de vidro, em local próximo às células de morfologia arredondada (Figuras 10a e 10b).

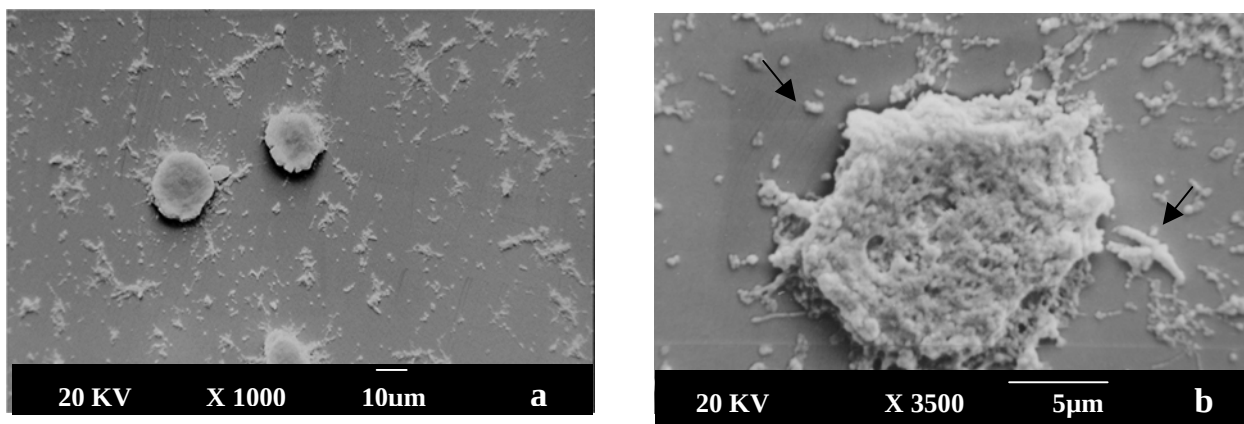


Figura 10 (a e b). Grupo controle positivo (HEMA). **a** – Presença de pequeno número de células aderidas à lamínula de vidro, com forma arredondada, tamanho reduzido e poucos prolongamentos citoplasmáticos. **b** – Detalhe de uma célula em processo de morte com rompimento de sua membrana citoplasmática e presença de estruturas sugestivas de restos de componentes celulares degradados (setas).

Grupos experimentais

Vitrebond (VB)

Para os quatro tempos de fotoativação estudados, poucas células MDPC-23 permaneceram aderidas ao substrato de vidro. A maioria destas células exibia tamanho reduzido, forma arredondada, com ausência ou presença de poucos prolongamentos citoplasmáticos que se apresentavam finos e curtos (Figura 11a). Semelhante ao observado para o grupo controle positivo (HEMA), algumas células pareciam estar em processo de morte com rompimento de sua membrana citoplasmática e, estruturas sugestivas de restos de células degradadas permaneceram aderidas ao substrato de vidro (Figura 11b).

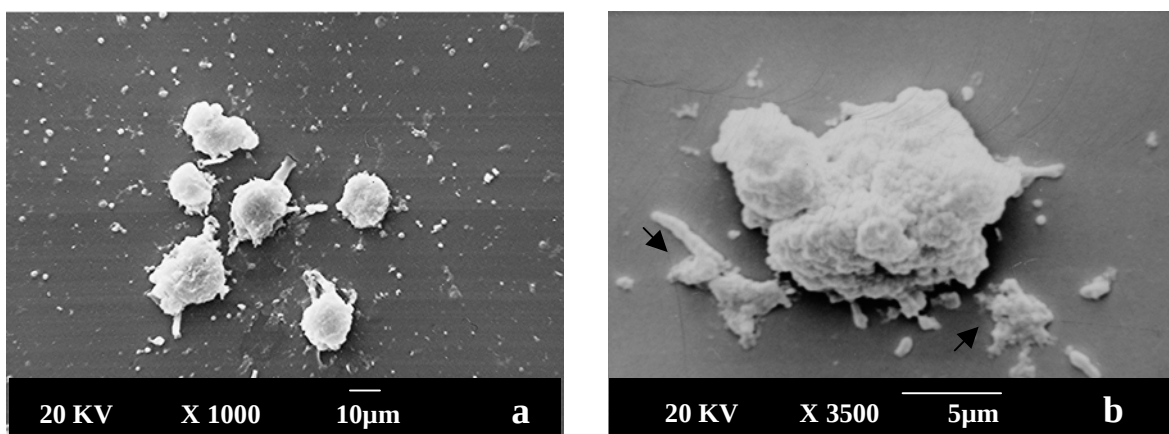


Figura 11. Vitrebond. **a** – Presença de poucas células de tamanho reduzido e de forma arredondada. **b** – Célula em processo de morte com rompimento da membrana citoplasmática e presença de restos de componentes celulares degradados (setas).

Fuji Lining LC (FL)

Para o grupo experimental, Fuji Lining LC, na ausência da fotoativação (T0), foram observadas poucas células MDPC-23 com características morfológicas de normalidade, semelhantes às aquelas apresentadas pelo grupo controle negativo (PBS). No entanto, a maioria das células presentes exibia forma arredondada e poucos prolongamentos citoplasmáticos curtos, originados de sua membrana (Figuras 12a e 12b).

Nas áreas onde células arredondadas estavam presentes, também foram observadas estruturas sugestivas de restos de células mortas, as quais permaneceram aderidas às lamínulas de vidro.

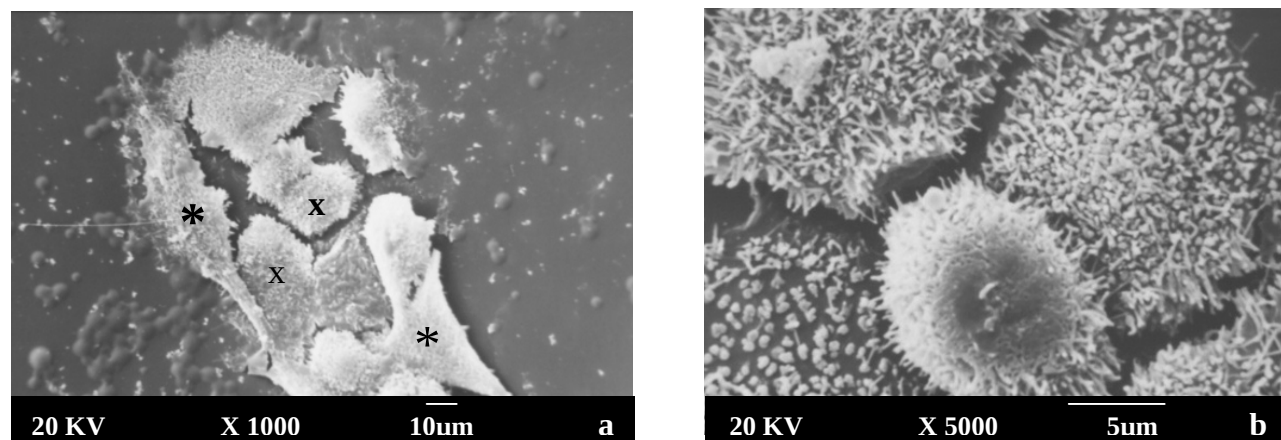


Figura 12. Fuji Lining LC (FL0). **a** – Poucas células alongadas (*) em meio a células arredondadas (x) com escassos prolongamentos citoplasmáticos. **b** – Detalhe de uma célula arredondada com finos prolongamentos citoplasmáticos.

Para os tempos de fotoativação 0,5 TRF (T1), tempo recomendado pelo fabricante (T2) e 1,5 TRF (T3), um maior número de células com morfologia alongada e com longos prolongamentos citoplasmáticos foi observado aderido à lamínula de vidro (Figura 13). Poucas células arredondadas com escassos prolongamentos citoplasmáticos também foram identificadas nestes tempos de fotoativação, embora em menor quantidade quando comparados com o tempo de fotoativação T0 (Figuras 14a e 14b). Nos locais com grande concentração de células com morfologia próxima à normalidade, poucos componentes residuais aderidos ao substrato de vidro foram observados.

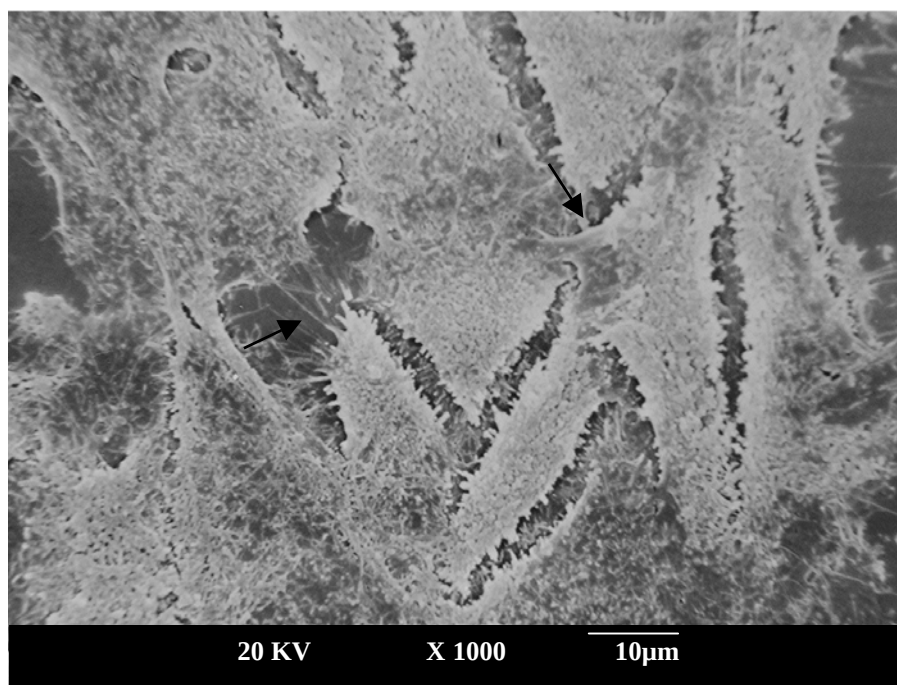


Figura 13. Fuji Lining LC (FL2). Células alongadas com grande número de prolongamentos citoplasmáticos (setas).

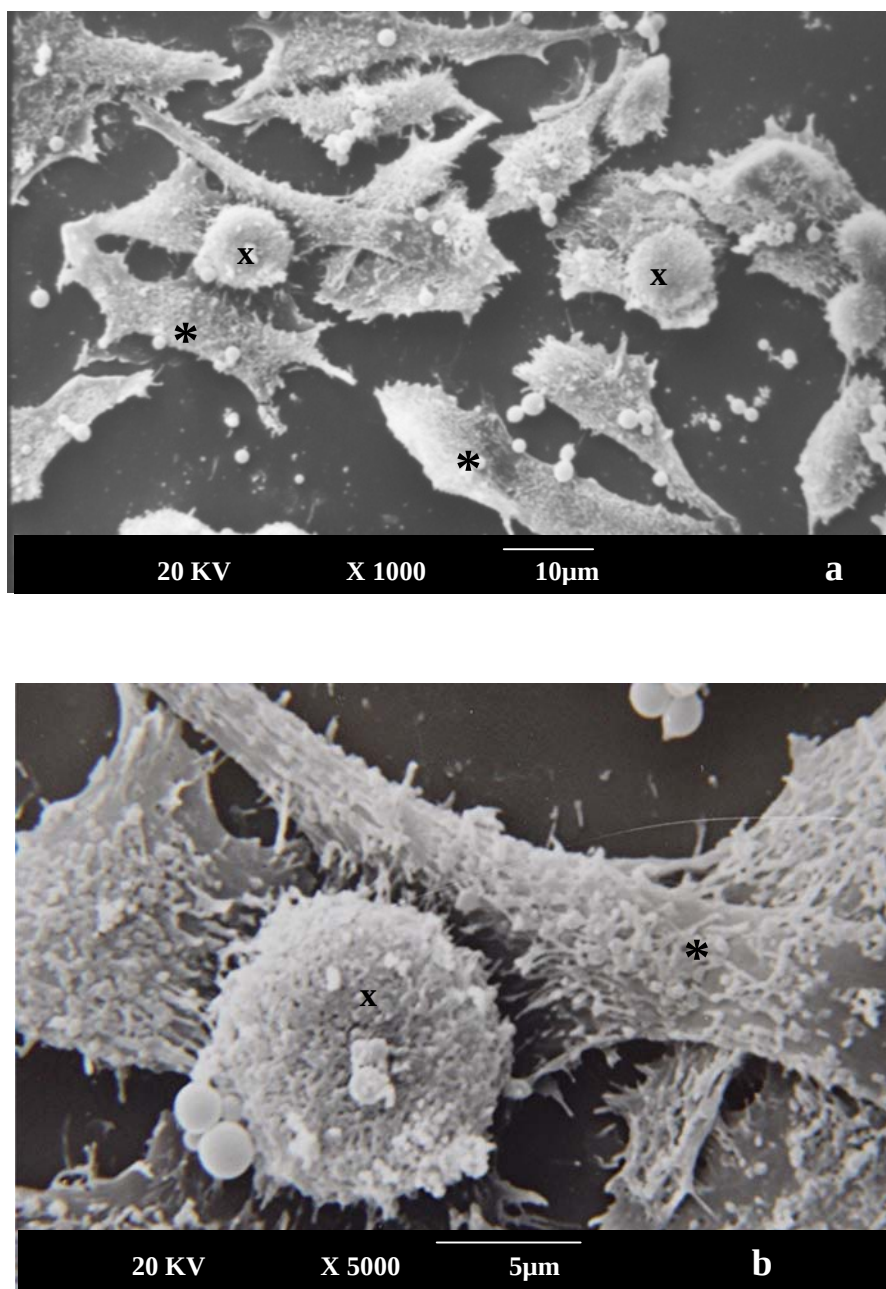


Figura 14. Fuji Lining LC (FL2). **a** – Poucas células arredondadas (x) em meio a grande número de células alongadas (*). **b** – Detalhe da relação entre célula arredondada (x) com finos prolongamentos citoplasmáticos e célula alongada (*) com características de normalidade.

DISCUSSÃO

Os testes em cultura de células têm sido amplamente utilizados para avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos (BOUILLAGUET et al.², 1996; COSTA et al.⁶, 2003; COSTA et al.⁹, 2003; HANKS et al.¹⁹, 1991; HUANG ; CHANG²¹, 2002; LEYHAUSEN et al.²⁹, 1998; LÖNNROTH ; DAHL³⁰, 2001; LÖNNROTH ; DAHL³¹, 2003). Entretanto, segundo MacDougal et al.³³ (1998), existe uma grande variabilidade entre as respostas citotóxicas de diferentes linhagens celulares aos materiais testados, sendo que até o momento, não há uma definição clara sobre qual é o tipo celular mais indicado para estes protocolos.

Os odontoblastos são células pulpares terminais que revestem internamente a câmara pulpar. Sendo assim, estas células são mais susceptíveis à ação tóxica de produtos liberados pelos materiais odontológicos, que se difundem através dos túbulos dentinários. No entanto, existem algumas dificuldades quanto ao uso de células com fenótipo de odontoblastos com relação à padronização de testes *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade, tais como: a variabilidade genética, a dificuldade de reprodutibilidade e a limitação do ciclo de vida (MacDOUGAL et al.³², 1992). Ao mesmo tempo, há a incapacidade dos odontoblastos em proliferar em

culturas primárias, o que resulta na dificuldade de obtenção destas culturas em laboratório. Também foi considerada a possibilidade destas células sofrerem indução para se diferenciarem em outro tipo celular (MacDOUGAL et al.³², 1992).

Com a finalidade de utilizar células com características semelhantes aos odontoblastos para os testes de citotoxicidade, células mesenquimais da papila dentária de primeiros molares inferiores de camundongos foram mantidas em regime 3T6 e induzidas a expressarem o fenótipo de odontoblastos em condições laboratoriais especiais. As células MDPC-23 (*Mouse Dental Papillae Cell*) foram caracterizadas como de linhagem odontoblástica pela morfologia epitelióide, presença de múltiplos prolongamentos citoplasmáticos, alta atividade da fosfatase alcalina, formação de nódulos e culturas em multicamadas quando mantidas em meio de cultura suplementado com ácido ascórbico e β -glicerofosfato e, principalmente, pela expressão de fosfoforina e sialoproteína da dentina (HANKS et al.¹⁹, 1998), as quais são sintetizadas exclusivamente por odontoblastos.

No presente estudo, por meio da avaliação morfológica, observou-se que para o grupo controle negativo (PBS), as células MDPC-23, permaneceram aderidas ao substrato de vidro em grande número e estavam organizadas em nódulos. Morfologicamente, estas células eram alongadas e

apresentavam numerosos prolongamentos citoplasmáticos, os quais pareciam promover a adesão das mesmas às lamínulas de vidro. Células com características semelhantes foram observadas com a utilização do Fuji Lining LC, quando este foi fotoativado por metade do tempo recomendado pelo fabricante (15s), pelo tempo recomendado pelo fabricante (30s) e por uma vez e meia o tempo recomendado pelo fabricante (45s). Todavia, as células em contato com o Fuji Lining LC não fotoativado estavam em número reduzido, sendo que a maioria apresentava morfologia arredondada, com poucos prolongamentos citoplasmáticos finos. A diferença na morfologia das células, quando o material Fuji Lining LC não foi fotoativado, pode ser decorrente da presença de maior quantidade de monômeros residuais que tornam o material mais tóxico às células (BOUILLAGUET et al.², 1996; OLIVA et al.⁴¹, 1996; STANISLAWSKI et al.⁴⁷, 1999). Entretanto, não foram encontrados, na literatura, estudos que tenham investigado a morfologia de células colocadas em contato com o cimento Fuji Lining LC.

Para o Vitrebond (grupo experimental) e para o HEMA (grupo controle positivo), as células apresentaram-se em número e tamanho reduzido e assumiram morfologia arredondada, com poucos ou nenhum prolongamento citoplasmático, originado de sua membrana. Segundo Costa et al.⁶ (2003), a redução do número de células pode ser explicada pela perda dos

prolongamentos citoplasmáticos que auxiliam na adesão celular ao substrato. Características morfológicas semelhantes também foram identificadas quando o Vitremer (COSTA et al.⁹, 2003) e o GC Lining Cement (LAN et al.²⁸, 2003) foram estudados. Por outro lado, Lan et al.²⁸ (2003) observaram apenas uma discreta alteração morfológica quando culturas de células pulpares humanas foram expostas ao Fuji II LC, o qual também representa um tipo de cimento de ionômero de vidro modificado por resina.

Para a avaliação da citotoxicidade, no presente estudo, também foi utilizado o método colorimétrico do Metiltetrazolium (teste do MTT), o qual determina o metabolismo celular de acordo com a taxa de respiração mitocondrial (MOSMANN³⁷, 1983). Schweikl e Schmalz⁴⁵ (1996) demonstraram que os testes colorimétricos de viabilidade celular, MTT e Vermelho Neutro, são mais sensíveis para os testes de citotoxicidade quando comparados aos protocolos de avaliação da proliferação celular, além de requererem um número relativamente reduzido de células e fornecerem um resultado rápido e confiável.

O Metiltetrazolium (MTT) é um sal de tetrazolium de coloração amarela capaz de detectar apenas as células viáveis. Os anéis de tetrazolium são clivados pela enzima desidrogenase succínica (SDH) presente nas mitocôndrias ativas, formando cristais de coloração violeta. Para a realização

da espectrofotometria, é necessária a solubilização destes cristais, a qual é realizada por meio da solução de isopropanol acidificado em HCl a 0,04 N (MOSMANN ³⁷, 1983). Os valores numéricos obtidos por meio do teste de MTT foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis, a qual identificou diferença quanto à taxa de atividade metabólica celular frente aos materiais estudados. O Vitrebond foi o material mais tóxico às células da linhagem odontoblástica MDPC-23, o que foi consistente com outros estudos (COSTA et al.⁹, 2003; GEURTSSEN et al.¹⁶, 1998; LEYHAUSEN et al.²⁹, 1998) e com a análise da morfologia celular realizada nesta pesquisa. Geurtsen et al.¹⁶ (1998) sugerem que o efeito altamente citotóxico do Vitrebond pode ser determinado pela liberação de produtos da degradação do fotoiniciador cloreto de difenil-iodo, como o cloro, o bromo, o iodo e o benzeno.

A literatura caracteriza os CIVMRs como materiais de presa *dual* devido a ocorrência de reação ácido-base e da polimerização dos monômeros resinosos por meio da ativação pela luz (BOURKE et al.³, 1992; GEE et al.¹⁵, 1998; KAKABOURA et al.²⁴, 1996; NICHOLSON ⁴⁰, 1998; WAN et al.⁴⁹, 1999; WILSON ⁵⁰, 1990). Alguns destes cimentos são identificados como materiais de presa tripla por apresentarem polimerização química dos monômeros (MOUNT ³⁸, 1994) além das duas reações descritas anteriormente.

Uma vez que durante a presa dos CIVMRs há a liberação de calor com conseqüente aumento da temperatura e há alteração do pH dos materiais, estas duas características do mecanismo de presa somadas à composição e à liberação de íons e monômeros resinosos pelos CIVMRs parecem ser os responsáveis pela citotoxicidade destes cimentos.

O aumento da temperatura dos cimentos de ionômero de vidro, durante a reação de presa, foi comprovado por Kanchanasita et al.²⁶ (1995), os quais demonstraram que os CIVMRs produzem um maior aumento da temperatura do que os cimentos de ionômero de vidro convencionais em função do processo de conversão dos monômeros. Durante a fotoativação ocorre um aumento de temperatura de 3 a 5°C (BOURKE et al.³, 1992; KANCHANASITA et al.²⁶, 1995), e esta variação térmica é reduzida imediatamente após a remoção da luz (KANCHANASITA et al.²⁶, 1995). Kanchanasita et al.²⁶ (1995) demonstraram, ainda, que o tempo de fotoativação superior ao tempo recomendado pelo fabricante não influenciou no aumento da temperatura, mas prolongou o período para que esta começasse a reduzir. No presente estudo, o aumento da temperatura durante a presa dos materiais estudados não exerceu influência na citotoxicidade, uma vez que de acordo com a metodologia empregada, após a fotoativação dos corpos de prova e antes do contato dos mesmos com o meio de cultura contendo as

células, houve um intervalo de tempo médio de 15 minutos para lavagem e posicionamento dos espécimes no interior dos compartimentos, tempo suficiente para que houvesse uma redução na temperatura.

Um outro fato importante a ser discutido é a alteração do pH dos materiais durante as reações de presa. A liberação de íons H^+ (KAWAI; TAKAOKA ²⁷, 2002) durante a reação ácido-base, mantém o pH dos cimentos de ionômero de vidro baixo por até 60 minutos (WOOLFORD ⁵², 1989; WOOLFORD; CHADWICK ⁵³, 1992), podendo causar danos ao tecido pulpar. Woolford e Chadwick ⁵³ (1992) observaram que a fotoativação de CIVMRs para forramento, Vitrebond e Baseline LC, aumentou significativamente o pH da superfície destes materiais, embora este valor ainda continuasse baixo. A reação ácido-base nos CIVMRs é mais lenta e prolongada pela presença do HEMA, uma vez que o monômero apresenta um grupo hidrofílico em sua composição e, durante sua conversão à cadeia polimérica, absorve água, a qual é essencial para a reação química (BOURKE et al. ³, 1992; KAKABOURA et al. ²⁴, 1996; NICHOLSON, ⁴⁰ 1998; WAN et al. ⁴⁹, 1999; WILSON, ⁵⁰ 1990;). Portanto, a liberação de ácido por estes cimentos híbridos ocorre por um tempo maior, mantendo o pH baixo por períodos mais prolongados (WOOLFORD; CHADWICK ⁵³, 1992). Este fato pode também explicar a maior citotoxicidade dos CIVMRs em relação aos

CIVs convencionais (CHEN et al.⁵, 2002; COSTA et al.⁹, 2003; LAN et al.²⁸, 2003; LEYHAUSEN et al.²⁹, 1998; OLIVA et al.⁴¹, 1996; SCHEDLE et al.⁴⁴, 1998) quando estes materiais são manipulados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

O fato de os cimentos estudados terem determinado respostas celulares variadas pode ser explicado pela diferença na sua composição (SIDHU; WATSON⁴⁶, 1995; WILSON⁵⁰, 1990). Embora todos os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina tenham em sua composição monômeros resinosos, tais como o HEMA, estes são encontrados em concentrações diferentes, de acordo com o material analisado. De modo geral, os cimentos para forramento de cavidades apresentam uma quantidade maior de HEMA em função de serem manipulados com uma menor proporção pó-líquido, o que lhes confere melhor consistência (FELTON et al.¹², 1991; GORDON¹⁷, 1991).

A liberação do HEMA pelos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina foi demonstrada em vários trabalhos (GEURTSEN et al.¹⁶, 1998; HAMID et al.¹⁸, 1998; KAWAI; TAKAOKA²⁷, 2002; PALMER et al.⁴², 1999). A toxicidade do monômero às células pulpare (BOUILLAGUET et al.², 1996; OLIVA et al.⁴¹, 1996; STANISLAWSKI et al.⁴⁷, 1999) e a sua capacidade de penetrar através dos túbulos dentinários e

atingir o tecido pulpar, em função de seu baixo peso molecular, também, foram descritas na literatura (BOUILLAGUET et al.², 1996; HAMID et al.¹⁸, 1998). Segundo Fujisawa et al.¹³ (1988), os monômeros metacrilato são incorporados na camada de lipídeos da membrana das células, provocando sua solubilização, com conseqüente morte celular. Isto comprova o papel do HEMA na citotoxicidade dos CIVMRs e a importância da sua conversão à matriz polimérica durante a presa destes materiais.

No presente estudo, o Vitrebond foi responsável por uma redução média de 80,7% do metabolismo das células MDPC-23. Associando este resultado ao fato de que o líquido do Vitrebond é composto por 20-30% de HEMA e não apresenta iniciadores da polimerização química dos monômeros resinosos, sugere-se que estes fatores correspondem as principais causas da maior citotoxicidade estatisticamente significativa deste material em relação ao Fuji Lining LC, cujo líquido apresenta uma quantidade muito inferior de HEMA (8-10%).

Além dos monômeros resinosos, os íons flúor, alumínio, prata, silício, estrôncio, zinco e silicato podem ser liberados durante o processo de presa e a degradação dos cimentos, sendo associados, também, a efeitos tóxicos às células (KAN et al.²⁵, 1997; LÖNNROTH; DAHL³⁰, 2001; KAWAI; TAKAOKA²⁷, 2002). Segundo Stanislawski et al.⁴⁷, 1999, a concentração dos

íons liberados pelos CIVMRs é muito baixa para ser citotóxica, com exceção do zinco que foi o único componente liberado em concentração suficiente para induzir efeitos tóxicos às células. No presente trabalho, quando os corpos de prova não fotoativados foram colocados em meio de cultura contendo as células MDPC-23, foi observada uma maior degradação dos materiais com a presença de resíduos decorrentes da solubilização dos mesmos, o que pode justificar a maior citotoxicidade do Fuji Lining LC no tempo T0 (ausência de fotoativação), em relação aos demais tempos de fotoativação.

Nesta pesquisa, o Fuji Lining LC, quando fotoativado, apresentou resultados similares aos do grupo controle negativo (PBS), o que significa que o material apresentou baixa toxicidade às células MDPC-23, reduzindo o metabolismo celular em apenas 9,3% (Figura 7). O teste de Kruskal-Wallis identificou uma diferença estatisticamente significativa na citotoxicidade do Fuji Lining LC de acordo com o tempo de fotoativação (Tabela 8). Ao aplicar o teste de Mann-Whitney aos dados obtidos por este material, observou-se que a ausência de fotoativação determinou uma citotoxicidade superior em relação aos tempos T1 (15s), T2 (30s) e T3 (45s) (Tabela 9 e Figura 8). Estes dados corroboram com os resultados obtidos no estudo de Palmer et al.⁴² (1999), no qual os autores demonstraram que para todos os CIVMRs estudados (Vitremer, Vitrebond, Fuji II LC e Fuji Lining LC), na ausência da irradiação

pela luz, houve uma maior liberação do HEMA. Assim, sugere-se que uma maior liberação de HEMA, determina uma maior toxicidade às células, uma vez que este, conforme demonstrado por Bouillaguet et al.² (1996); Oliva et al.⁴¹ (1996); Stanislawski et al.⁴⁷ (1999), é responsável por efeitos celulares adversos.

De acordo com o que foi sugerido por Palmer et al.⁴² et al (1999), o Fuji Lining LC apresenta uma quantidade pequena de iniciadores, responsáveis pela polimerização química do monômero resinoso, em comparação aos iniciadores ativados pela luz. Dessa forma, na ausência de fotoativação, há um menor grau de conversão do monômero em polímero, com uma liberação maior de HEMA residual, aumentando a citotoxicidade. A conversão dos monômeros, provavelmente, é maior quando há combinação entre a ação dos iniciadores da fotoativação e dos iniciadores da polimerização química, o que reforça a diferença do grupo FL0 em relação aos demais (FL1, FL2 e FL3).

No presente estudo, pôde-se observar também que quando foi realizada a fotoativação, independente do tempo utilizado (15s, 30s ou 45s), não houve diferença estatisticamente significativa na citotoxicidade do Fuji Lining LC, sendo que neste grupo experimental ocorreu uma redução no metabolismo celular de 5,7%; 0% e 0,3%, respectivamente (Figura 8). Este resultado sugere que quando é realizada a fotoativação, o tempo de irradiação pela luz não

interfere na conversão dos monômeros à cadeia polimérica, o que não está de acordo com o estudo de Palmer et al.⁴² (1999) e, reforça a hipótese de que outros fatores, tais como: composição, produtos liberados pela solubilização do material, alteração do pH e da temperatura durante a reação de presa, bem como, o sistema de polimerização empregado, somados à liberação do HEMA, determinam em conjunto, a citotoxicidade dos CIVMRs.

A redução da atividade metabólica celular causada pelo Vitrebond foi cerca de 84,3% na ausência de ativação pela luz (0s), 80% quando foi fotoativado por 0,5 TRF (15s) e aproximadamente 79% quando foi fotoativado pelo tempo recomendado pelo fabricante (30s) e 1,5 TRF (45s) (Figura 8). Estes resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si, o que discorda do trabalho de Palmer et al.⁴² (1999), segundo o qual, a fotoativação do Vitrebond promoveu maior grau de conversão do HEMA e conseqüentemente, deveria provocar uma menor toxicidade às células. Este fato pode ser explicado pela alta toxicidade do Vitrebond às células MDPC-23 em função da liberação de outros componentes tóxicos além do HEMA, bem como pela manutenção do pH com valor baixo por tempo prolongado (WOOLFORD; CHADWICK,⁵³ 1992).

Comparando-se os dois materiais nas mesmas condições laboratoriais, observou-se que o Vitrebond foi sempre mais citotóxico do que o Fuji Lining

LC. O grupo VB0 apresentou citotoxicidade estatisticamente superior (84,3% de redução do metabolismo celular) ao grupo FL0 (43,1% de redução do metabolismo celular), o que pode ser decorrente da ausência de iniciadores químicos de polimerização dos monômeros na composição do Vitrebond. Palmer et al.⁴² (1999) observaram que na ausência de fotoativação, tanto o Vitremer quanto o Fuji II LC e o Fuji Lining LC tomaram presa antes de completar 6 minutos após a manipulação e liberaram menores concentrações de HEMA num período de 4 horas (1%, 6% e 4%, respectivamente), sugerindo a presença de iniciadores químicos na composição do Fuji Lining LC. Por outro lado, o Vitrebond demorou 15 minutos para tomar presa e liberou 50% de HEMA. Estes resultados sugerem que na ausência de luz, o Fuji Lining LC apresenta polimerização química do HEMA associada à reação ácido-base, o que não ocorre para o Vitrebond. Sendo assim, este apresenta uma maior quantidade de monômeros não reagidos, os quais são liberados pelo material, resultando em maior degradação e conseqüentemente, em maior toxicidade sobre células em cultura.

A biocompatibilidade dos CIVMRs foi analisada em animais (COSTA et al.⁸, 2003; FELTON et al.¹², 1991; GAINANTZOPOULOU et al.¹⁴, 1994; TARIM et al.⁴⁸, 1998) e em humanos (COSTA et al.⁷, 2003; NASCIMENTO et al.³⁹, 2000). O Vitrebond quando foi utilizado para o

forramento de cavidades profundas com a manutenção da camada de *smear layer* em dentes de cães (GAINTANTZOPOULOU et al.¹⁴, 1994) e em dentes humanos (COSTA et al.⁷, 2003), foi bem tolerado pelos tecidos pulpaes, com ausência de resposta inflamatória e de desorganização tecidual. Costa et al.⁸ (2003) realizaram o capeamento de polpas expostas de dentes de ratos com Vitrebond e observaram formação de fibrodentina rica em células, seguida de ponte de dentina. Estes resultados não foram consistentes com aqueles obtidos por Nascimento et al.³⁹ (2000), que capearam exposições pulpaes de pré-molares humanos e identificaram resposta inflamatória de intensidade moderada, zona de necrose extensa, assim como a ausência de formação de ponte dentinária. Em ambos os trabalhos de pesquisa, os autores demonstraram que componentes do Vitrebond se solubilizaram em contato com o tecido pulpar e, conseqüentemente, se difundiram para o interior deste tecido. Todavia, de acordo com os autores esta divergência de resposta tecidual pode ter ocorrido pela diferença no metabolismo celular e capacidade de reparação tecidual de ambos os modelos experimentais.

Assim, segundo os resultados da presente pesquisa e os dados científicos que caracterizam a falta de compatibilidade biológica do Vitrebond, especialmente de seus componentes solúveis, quando aplicado

sobre a polpa de dentes humanos, conclui-se que este material não deve ser recomendado para aplicação direta sobre este tecido conjuntivo.

Embora os resultados do presente trabalho mostrem uma menor citotoxicidade do Fuji Lining LC em relação ao Vitrebond, estes não podem ser extrapolados para as situações clínicas, uma vez que os trabalhos em cultura de células representam apenas o primeiro nível de pesquisa, sendo necessários mais estudos nos níveis secundário e de aplicação clínica (ANSI/ADA ¹, 1982; ISO ²³, 1992), antes da indicação de um material para os procedimentos de rotina em seres humanos. Todavia, pesquisas recentemente publicadas (GEURTSEN et al. ¹⁶, 1998; KAN et al. ²⁵, 1997; LONNROTH; DAWL ³⁰, 2001; NASCIMENTO et al. ³⁹, 2000; STANISLAWSKI et al. ⁴⁷, 1999) parecem concordar com o fato de que os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina, durante a reação de presa e em contato com umidade, podem liberar componentes químicos tóxicos ao tecido pulpar.

CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais deste trabalho e baseado nos resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

- O Vitrebond mostrou-se mais tóxico às células de linhagem odontoblástica MDPC-23, provocando uma redução média de 80,7% do metabolismo celular, enquanto que o Fuji Lining LC apresentou baixa citotoxicidade com redução média de 9,3 % do metabolismo celular.
- O tempo de fotoativação não exerceu influência sobre a citotoxicidade dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento, Vitrebond e Fuji Lining LC.
- A ausência de fotoativação foi responsável pelo aumento da citotoxicidade para o Fuji Lining LC.

REFERÊNCIAS*

1. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ANSI-ADA document no. 41 for Biological Evaluation of Dental Materials. Chicago: ADA; 1982.
2. BOUILLAGUET, S. et al. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. **J. Endod**, Baltimore, v. 22, n.5, p.244-248, May 1996.
3. BOURKE, A. M.; WALLS, A. W.; McCABE, J. F. Light-activated glass polyalkenoate (ionomer) cements: the setting reaction. **J. Dent.**, Guildford, v. 20, n.2, p.115-120, Oct. 1992.
4. BRÄNNSTRÖM, M.; MATTSSON, B.; TORSTENSON. Materials techniques for lining composite resin restorations: a critical approach. **J. Dent.**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 71-79, Jan. 1991.
5. CHEN, C. C.; CHEN, R. C. S.; HUANG, S. T. Enzymatic responses of human deciduous pulpal fibroblasts to dental restorative materials. **J. Biomed. Mater Res.**, New York, v. 60, n.3, p. 452-457, June 2002.
6. COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; HANKS, C. T. Effects of light -curing time on the citotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. **Oper. Dent.**, Seattle, v. 28, n. 4, p. 365-370, July/Aug. 2003.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

7. COSTA, C. A. S. et al. Short-term of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. **Dent. Mater**, Copenhagen, v. 19, n.8, p. 739-746, Dec. 2003.
8. COSTA, C. A. S. et al. Biocompatibility of resin-based materials as pulp-capping agents. **Int. Endod. J.**, v. 36, n.12, p. 831-839, Dec.2003.
9. COSTA, C. A. S. et al. *In vitro* citotoxicity of five glass-ionomer cements. **Biomaterials**, Guildford, v.24, n.21, p. 3853-3858, Sept. 2003.
- 10.DHONDT, C. L.; MAEYER, E. A. P.; VERBEECK, R. M. H. Fluoride release from glass ionomer activated with fluoride solutions. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.80, n.5, p. 1402-1406, May 2001.
- 11.DONLY, K. J.; SEGURA, A. Fluoride release and caries on inhibition associated with a resin-modified glass-ionomer cement at varying fluoride loading doses. **Am J. Dent.**, San Antonio, v.15, n.1, p.8-10, Feb. 2002.
- 12.FELTON, D. A. et al. Pulpal response to chemically cured and experimental light-cured glass ionomer cavity liners. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 65, n. 5, p. 704-712, May 1991.
- 13.FUJISAWA, S.; KADOMA, Y.; KOMODA, Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast

- membranes. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.67, n.11, p.1438-1441, Nov. 1988.
- 14.GAINTANTZOPOULOU, M. D.; WILLIS, G. P.; KAFRAWY, A., H. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 7, n.1, p. 39-42, Feb. 1994.
- 15.GEE, A. J. et al. Structural integrity of resin-modified glass ionomers as affected by the delay or omission of light activation. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v.77, n.8, p. 1658-1663, Aug. 1998.
- 16.GEURTSEN, W.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 77, n.12, p. 2012-2019, Dec. 1998.
- 17.GORDON, J. C. To base or not to base ? **J. Am. Dental Assoc.**, Chicago, v. 122, p. 61-62, June 1991.
- 18.HAMID, A. et al. Component release from light-activated glass ionomer and compomer cements. **J. Oral Rehabilitation.**, Oxford, v. 25, n.2, p. 94-99, Feb. 1998.
- 19.HANKS, C. T.; STRAWN, S. E.; WATAHA, J. C. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 70, n. 11, p. 1450-1455, Nov. 1991.

- 20.HANKS, C. T. et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connective Tissue Res.**, London, v.37, n.3-4, p.233-249 1998.
- 21.HUANG, F. M.; CHANG, Y. C. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. **Oral Surg. Oral Med. Oral. Pathol. Oral Radio. Endod.**, St Louis, v.94, n.3, p. 361-365, Sept. 2002.
22. HUME, W. R.; MOUNT, OG. J. *In vitro* studies on the potential for pulpal cytotoxicity of glass-ionomer cements. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 67, n. 6, p. 915-918, June 1988.
- 23.INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.
Biological testing of medical, dental materials and devices-Part 1: Guidance on selection tests. Ref. 10993-1, Geneva: 180, 1992.
- 24.KAKABOURA, A.; ELAIDES, G.; PALAGHIAS, G. An FTIR study on the setting mechanism of resin-modified glass ionomer restoratives. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 12, n.3, p. 173-178, May 1996.
- 25.KAN, K. C.; MESSER, L. B.; MESSER, H. H. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 76, n. 8, p. 1502-1507, Aug. 1997.

- 26.KANCHANAVASITA, W.; PEARSON, G. J.; ANSTICE, H. M.
Temperature rise in ion-leachable cements during setting reaction.
Biomaterials, Guildford, v. 16, n. 16, p. 1261-1265, Nov. 1995.
- 27.KAWAI, K.; TAKAOKA, T. Fluoride , hydrogen ion and HEMA release
from light-cured GIC restoratives. **Am. J. Dent**, San Antonio, v.15, n.3,
p. 149-152, June 2002.
- 28.LAN, W. H. et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass
ionomer cements. **Oper. Dent.**, Seattle, v. 28, n. 3, p. 251-259, May/June
2003.
- 29.LEYHAUSEN, G. et al. Biocompatibility of various light-curing and one
conventional glass-ionomer cement. **Biomaterials**, Guildford, v. 19, n.6,
p.559-564, Mar. 1998.
- 30.LÖNNROTH, E. C.; DAHL, J. E. Cytotoxicity of dental glass ionomers
evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests.
Acta Odontol. Scand., Oslo, v. 59, n. 1, p.34-39, Feb. 2001.
- 31.LÖNNROTH, E. C.; DAHL, J. E. Cytotoxicity of liquids and powders of
chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol
diphenyltetrazolium and neutral red tests. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.
61, n.1, p. 52-56, Feb. 2003.

- 32.MACDOUGAL, M. et al. Expression of dentin extracellular matrix proteins by odontoblastic cell cultures. In: SLAVKIN, H.; PRICE, P. Chemistry and biology of mineralized tissues. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992. p. 117-124.
- 33.MACDOUGAL, M. et al. Immortalized odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. **Am J. Dent.**, San Antonio, v. 10, p. 11-16. 1998
- 34.MALDONADO, A.; SWARTZ, M. L.; PHILLIPS, R. W. An in vitro study of certain properties of a glass ionomer cement. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 96, n.5, p. 785-791, May 1978.
- 35.MATHIS, R. S.; FERRACANE, J. L. Properties of a glass-ionomer/resin-composite hybrid material. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.5, n.5, p.355-358, Sept. 1989.
- 36.MERYON, S. D.; STEPHENS, P. G.; BROWNW, R. M. A comparision of the in vitro cytotoxicity of two glass-ionomer cements. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 62, n. 6, p. 769-773, June 1983.
- 37.MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

- 38.MOUNT, G. J. Glass-ionomer cements and future research. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 7, n. 5, p. 286-292, Oct. 1994.
- 39.NASCIMENTO, A. B. L. et al. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 13, .n.1, p. 28-34, Feb. 2000
- 40.NICHOLSON, J. W. Chemistry of glass-ionomer cements: a review. **Biomaterials**, Guildford, v. 19, n.6, p. 485-494, Mar. 1998.
- 41.OLIVA, A. et al. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. **Biomaterials**, Guildford, v. 17, n. 13, p. 1351-1356, July 1996.
- 42.PALMER, G.; ANSTICE, H. M.; PEARSON, G. J. The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. **J. Dent.**, Guildford, v.27, n.4, p.303-311, May 1999.
- 43.RUEGGEBERG, F. A.; CAUGHMAN, W. F.; CURTIS, J. W. Effect of light intensity and exposure duration on cure of resin composite. **Oper. Dent.**, Seattle, v. 19, n.1, p. 26-32,Jan./Feb. 1994.
- 44.SCHEDLE, A. et al. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive, compomers and cements. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v.14, n. 6, p. 429-440, Nov. 1998.

- 45.SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 104, n.3, p. 292-299, June 1996.
- 46.SIDHU, S. K.; WATSON, T. F. Resin-modified glass ionomer materials. A status report for the American Journal of Dentistry. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v.8, n.1, p. 59-67, Feb. 1995.
- 47.STANISLAWSKI, L. et al. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. **J. Biomed Mater Res.**, New York, v.49, n. 3, Feb. 1999.
- 48.TARIM, B.; HAFEZ, A.; COX, C. F. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. **Quintessence Int.**, Illinois, v. 29, n. 8, p. 535-542, Aug. 1998.
- 49.WAN, A. C. A.; YAP, A. U. J.; HASTINGS, G. W. Acid-base complex reactions in resin-modified and conventional glass ionomer cements. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 48, n. 5, p. 700-704, Mar. 1999.
- 50.WILSON, A. D. Resin-modified glass-ionomer cements. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.3, n. 5, p. 425-429, Sept./Oct. 1990.
- 51.WILSON, A. D.; KENT, B. E. A new translucent dental filling material: The glass-ionomer cement. **Br. Dent. J.**, London, v.132, n.4, p. 313, Feb. 1972.

52. WOOLFORD, M. J. The surface pH of glass ionomer cavity lining agents. **J. Dent.**, Guildford, v. 17, n.6, p. 295-300, Dec. 1989.
53. WOOLFORD, M. J.; CHADWICK, R. G. Surface pH of resin-modified glass polyalkenoate (ionômero) cements. **J. Dent.**, Guildford, v. 20, n.6, p. 359-364, Dec. 1992.

ARANHA, A. M. F. Efeito do tempo de fotoativação na citotoxicidade de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina em células de linhagem odontoblástica. Araraquara, 2004, 133p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina para forramento, quando submetidos a diferentes tempos de fotoativação, utilizando cultura de células imortalizadas de linhagem odontoblástica (MDPC-23). Foram confeccionados 40 espécimes de cada material experimental (Fuji Lining LC e Vitrebond). Filtros de papel embebidos com 5µL de PBS ou com 5µL de HEMA puro foram usados como controle negativo e positivo (n = 10), respectivamente. Quatro diferentes tempos de fotoativação foram avaliados: ausência de fotoativação, metade do tempo recomendado pelo fabricante (15s), tempo recomendado pelo fabricante (30s) e uma vez e meia o tempo recomendado pelo fabricante (45s). Os espécimes foram posicionados em compartimentos de recipientes plásticos para cultura de células e, 1 mL do meio de cultura DMEM suplementado, contendo cerca de 3×10^4 células MDPC-23/cm² foi introduzido em cada um dos mesmos. Em seguida, estes foram mantidos por 72 horas em estufa com 100% de umidade à 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. A citotoxicidade foi avaliada por meio do teste de viabilidade celular (teste do MTT) e da análise da morfologia celular pela microscopia eletrônica de varredura. A análise estatística determinou que o Fuji Lining LC apresentou

menor citotoxicidade que o Vitrebond ($p < 0,05$) e ambos os materiais proporcionaram uma redução no metabolismo celular de 9,3% e 80,7%, respectivamente. A citotoxicidade do Fuji Lining LC aumentou acentuadamente na ausência de irradiação pela luz, entretanto o mesmo não foi observado para o Vitrebond. O tempo de fotoativação não exerceu influência na toxicidade de ambos os cimentos para forramento quando estes foram aplicados sobre a cultura de células da linhagem odontoblástica-MDPC-23.

PALAVRAS-CHAVES: cimentos de ionômero de vidro; testes de materiais; odontoblastos.

ARANHA, A. M. F. Effect of light-curing time on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. Araraquara, 2004, 133p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study was to evaluate the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements submitted to different light-curing times, applied to an immortalized odontoblast-cell line. Forty round-shaped specimens of each experimental material (Fuji Lining LC and Vitrebond) were prepared. Sterilized filter papers soaked with either 5µL of PBS or 5µL of pure HEMA were used as negative and positive control (n = 10), respectively. Four different light-curing times were evaluated: no light activation, light activation for half of the time recommended by the manufactures (15s), manufacturers’ recommended time (30s) and light activation for 1.5 times the manufacturers’ recommended time (45s). The specimens were placed into wells of 24-well dishes and odontoblast-like cells MDPC-23 were plated at 3×10^4 cells/cm² in each well. Culture medium (DMEM) with 10% of fetal bovine serum, supplemented with penicillin, streptomycin and glutamine was used. Finally, the well dishes were maintained for 72 hours in a humidified incubator at 37°C, with 5% of CO₂ and 95% air. The cytotoxicity was evaluated by the test of cellular viability, Methyltetrazolium assay (MTT) and the cell morphology was assessed using a scanning electron microscope (SEM). The statistical analysis determined that Fuji Lining LC was less cytotoxic than Vitrebond (p <0,05) and both materials provided a reduction in the cellular metabolism of 9,3% and 80,7%, respectively. The cytotoxicity of

Fuji Lining LC remarkably increased in the absence of light activation, while the same was not observed for Vitrebond. The length of light curing (15s, 30s and 45s) did not influence the toxicity of both lining materials when applied on a odontoblast-cell line-MDPC-23.

KEY WORDS: glass ionomer cements; materials tests; odontoblasts.

APÊNDICE

Apêndice 1. (Tabela 1 e Tabela 2): Apresentação dos valores, em miligramas, referentes a calibração do operador com relação à proporção pó/líquido durante manipulação dos materiais experimentais.

Tabela 1. Apresentação dos valores, em miligramas, com relação à proporção pó/líquido.

Material	Peso (mg)	
	Pó	Líquido
VB	48,8	38,1
	46,3	36,8
	47,8	38,5
	47,2	37,0
	48,7	40,1
	48,4	36,9
	49,2	38,3
	49,0	38,4
	48,0	37,8
	49,4	37,2
FL	40,5	30,0
	38,1	29,4
	40,5	29,2
	38,9	29,1
	37,8	33,0
	40,9	32,0
	40,3	29,2
	38,0	29,0
	40,5	28,5
	40,8	30,1

Tabela 2. Análise descritiva dos dados referentes à proporção pó/líquido dos materiais estudados.

Material		Média	Desvio-padrão	Coef. De variação
Vitrebond	Pó	48,3	1,0	2%
	Líquido	37,9	1,0	2,6%
Fuji Lining LC	Pó	39,6	1,0	3,3%
	Líquido	30,0	1,4	4,7%

Apêndice 2. Apresentação dos valores referentes ao metabolismo celular dos materiais estudados.

VALORES REFERENTES AO METABOLISMO CELULAR										
N	VB0	VB1	VB2	VB3	FL0	FL1	FL2	FL3	HEMA	PBS
1	0,061	0,054	0,071	0,083	0,286	0,234	0,286	0,344	0,055	0,240
2	0,049	0,063	0,078	0,067	0,235	0,182	0,303	0,221	0,051	0,290
3	0,072	0,047	0,110	0,046	0,162	0,262	0,384	0,265	0,051	0,380
4	0,047	0,089	0,044	0,045	0,140	0,209	0,324	0,213	0,070	0,260
5	0,052	0,044	0,075	0,071	0,150	0,453	0,436	0,444	0,064	0,400
6	0,051	0,063	0,044	0,116	0,169	0,402	0,428	0,395	0,053	0,420
7	0,050	0,053	0,083	0,066	0,191	0,380	0,418	0,395	0,049	0,310
8	0,063	0,095	0,044	0,053	0,176	0,383	0,384	0,372	0,049	0,360