Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia

Campus de Araraquara

Adriano Augusto Melo de Mendonça

Influência da smear layer e sua espessura na adesão e citotoxicidade de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas - Área de Dentística Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista , para obtenção do título de Doutor em Dentística Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2009

ADRIANO AUGUSTO MELO DE MENDONÇA

INFLUÊNCIA DA SMEAR LAYER E SUA ESPESSURA NA ADESÃOE E CITOTOXICIDADE DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO POR RESINA

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

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

2º Examinador: Profa. Dra. Célia Regina Moreira Lanza

3º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves Campos

4º Examinador:Prof. Dr. José Roberto Cury Saad

5º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade

Araraquara, 23 de março de 2009.

ADRIANO AUGUSTO MELO DE MENDONÇA

NASCIMENTO	08/ 07/ 1976, em Belo Horizonte, MG.
FILIAÇÃO	Luiz Augusto Mendonça
	Maria de Lourdes Côrrea de Melo Mendonça
1997-2000	Graduado pela Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas – EFOA
2001-2003	Curso de Especialização em Dentística Restauradora pela Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO
2003-2005	Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, Universidade Estadual Paulista – UNESP
2005-2006	Professor Substituto da Disciplina de Prótese Fixa Unitária na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG
2005-2009	Curso de Pós-Graduação em Dentística Restauradora, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, Universidade Estadual Paulista – UNESP

DEDICATÓRIA...

A DEUS...

Pai... é chegada a etapa final deste trabalho. Entretanto, este momento só foi possível graças à tudo e todos que estiveram presente comigo por Sua intercessão.

Obrigado Pai, por ter me concedido a graça de ser gerado por pais maravilhosos, os quais são fontes de inspiração, conduta, ética e perseverança. Obrigado por ter unido duas metades a uma só pessoa representada por Luiz Augusto Mendonça e Maria de Lourdes. Ele, meu pai, sempre foi para mim motivo de exemplo, pessoa pela qual primo a dedicação pela família, aos estudos, ao trabalho, enraizado no princípio de que tudo só dará frutos bons, se a planta for cultivada e adubada com o sentimento denominado de AMOR. Ela, minha mãe, é para mim pessoa serena, dotada de inteligência da qual nunca pude presenciar nem mesmo no mais nobre sábio já citado, governada pelo espírito do amor, o qual sempre governou suas atitudes. Foi por ter este casal sempre

presente na minha vida, que hoje sou o que sou e sei que posso ser sempre algo mais, guiado pela presença de AMOR plantado por eles em mim.

Obrigado Pai, pelas minhas três companheiras de jornada: Márcia, Valquíria e Patrícia, irmãs que são chave e pilar essencial em todas as minhas condutas. Cada uma delas compareceu em momento oportuno, nos quais eu me encontrava mergulhado em dúvidas. Entretanto, o Senhor sempre as colocou em meu caminho, transmitindo através delas, os conselhos necessários para que eu pudesse arrancar energia para continuação da minha jornada.

Obrigado Pai, pelos pequenos frutos presentes em minha vida: meus sobrinhos – Lara Beatriz, Nicolas e Gabriel. Crianças maravilhosas, que com o dom do sorriso e da inocência, sempre me encheram de alegria e de força em cada momento de fraqueja e

angústia. Era sobre este três pilares que pude renovar em casa, a alegria de saber o quão bom é ser criança novamente.

Meu Deus, obrigado também pela presença da minha namorada, amiga, cúmplice e hoje, noiva e futura esposa - Fabrícia. Fazinha, você sempre soube estar ao meu lado e acompanhar-me em cada momento desta jornada que quando mais próximo da final, mais penosa me parecia. Entretanto, este dia de glória só foi possível também por você estar presente ao meu lado. TE AMO.

Agradeço também ao meu futuro sogro (Sr. Ibrahim) e sogra (Marilene), juntamente com Matheus e Thomaz, pela acolhida com que me receberam em todos estes anos de minha jornada em Araraquara.

É por todos eles, meu Pai, que dedico este trabalho. E pelo Senhor que oferto os meus sacrifícios e minha alegria, mesmo sabendo que em determinados momentos, fui tolo ao duvidar de sua existência. Assim, peço desculpas pela minha ignorância e perdão

pela minha ausência de filho, mas agradecendo sempre a sua misericórdia.

Assim seja. Amém.

AGRADECIMENTO ESPECIAIS

Obrigado Darlonzeira, pela sua amizade presente desde os momentos de especialização até hoje. Tenho dentro de mim que esta amizade é eterna. Você sempre foi para mim o irmão que nunca tive, compartilhando dos momentos bons e ruins vividos em Araraquara. Foi através de cada momento vivido que pude desfrutar da nossa amizade, das conversas que se fizeram presentes e do meu aprendizado constante com você sobre como encarar a vida com tranqüilidade e serenidade.

Ao meu amigo e também querido irmão Rinaldo Teles. Naldinho, eu quero que você considere este momento, o seu momento e que saiba que tudo nesta vida não acontece sem razão e motivo. Obrigado por ter estado presente quando estive em Araraquara. Continuo sempre contando com você, meu amigo.

Ao querido amigo, Murilo, pessoa especial e honesta, com quem tive o privilégio de ter conhecido no doutorado e solidificado uma grande amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto, pessoa pela qual preso o respeito pela pesquisa e admiro sua dedicação à docência e pesquisa, procurando sempre transmitir aos seus orientados a forma mais nobre de se ter ética, não só na pesquisa, mas também nos momentos do dia-a-dia.

À profa Dra. Josimeri Hebling pela sua paciência e dedicação no ensino da odontologia e da estatística. Muito obrigado professora pela sua convivência.

A minha amiga Professora Salete Machado Candido. Professora, a senhora me fez enxergar o quão bonita a senhora é. Desde o período de especialização até o doutorado, pude conviver com a senhora, observando a sua grandeza como pessoa, a sua gentileza no ensino e sua competência como docente. Obrigado professora Salete, hoje também uma grande amiga (In memorian).

Ao professor José Roberto Cury Saad, por ter acreditado em mim e ter me prestigiado com sua amizade. Saiba que para mim, o senhor é motivo de respeito e humildade dentro deste gigante que é a UNESP –Araraquara. Professor Saad, muito obrigado.

À minha amiga Mara, que sempre se mostrou solícita e compreensiva diante nossas aflições. Que você sempre continue com este coração enorme que não cabe dentro de você. Marinha, você é uma pessoal especial.

Ã minha amiga Creusa por todo apoio, carinho e amizade para comigo durante todo este período de pós-graduação.

O meu amigo Caco que sempre esteve presente nos momentos de descontração, aconselhando também sempre sobre qual a melhor forma de poder encarar os fatos com tranqüilidade e sem desespero.

Ao meu amigo e sempre professor Paulo Antônio de Arantes Vieira, pessoa ilustre a qual me direcionou para o caminho da docência.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua ex-diretora Prof. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, atual diretor José Cláudio Martins Segalla e vice-diretora Andréia Affonso Barreto Montandon.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Capes- Brasil, pelo financiamento de minha estada e meus estudos em Araraquara.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação por toda solicitude e carinho no atendimento a nós alunos.

Aos professores de Dentística Restauradora Marcelo Ferrarezi de Andrade, Maria Salete Machado Candido (in memorian), José Roberto Cury Saad, Sizenando de Toledo Porto Neto e Osmir Batista de Oliveira Júnior pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Elisa pela sua companhia, simplicidade, sempre disponibilidade no atendimento para o ensino.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, nas pessoas de Creuza, Adriana, Dona Cidas, Vanderley e Marinho, pela acolhida, amizade e trato durante todos estes anos de pós-graduação.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação, Darlon, Hugo Henriques, Adriana, Carol de Deus, Martin, Elídio, Milko, Ubiracy, Renatinho, Cristiane, André, Victor Clavijo, Lemon, Rafa, Benícia, Simone, Priscila, Matheus, Esther, Fernando, Alvarenga, Ju e Gislaine pela convivência na pós-graduação.

Aos meninos que sempre me receberam de braços abertos Luquinha, Gui, Popotinha, João. Vocês são simplesmente espetaculares.

Aos amigos de Pós-Graduação Célia Lanza, Zeca, Brodinho (Lu), Zé Maurício, João Gustavo, Matheus, Hermes, Vagner, Andress, Norberto, Fabiano, Mari pela presença de vocês.

Aos amigos do Laboratório de Patologia experimental Camila Fávero, Nancy, Célia, Indri, Ana Paula, Flávia, Fernanda, Andreza, Castelo, Fer Vargas, Juliana Pirola (Juju) e Kina pela estadia e discussões científicas realizadas no laboratório.

Aos funcionários da biblioteca, nas pessoas de Maria Helena, Ceres, Marley, Adriano, Sílvia, Inês e Elaine, pelo pronto atendimento e simpatia.

Ao professor, Roberto Barbeiro, por ter oferecido um espaço no seu curso para obtenção das amostras de meu experimento.

À Capes por ter fornecido suporte financeiro para execução deste trabalho

A todos os demais que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo 20

Abstract 24

1 INTRODUÇÃO 26

2 REVISÃO DE LITERATURA 35

2.1 Resistência de união 35

2.2 Citotoxicidade e biocompatibilidade 43

3 PROPOSIÇÃO 64

4 MATERIAL E MÉTODO 66

4.1 Manutenção das células MDPC-23 em cultura 66

4.2 Obtenção dos discos de dentina 66

4.3 Determinação da permeabilidade dentinária (condutância hidráulica) 70

4.4 Preparo da *Smear layer* 75

4.5 Câmara Pulpar Artificial (CPA) 76

4.6 Tratamento da smear layer 78

4.7 Cultivo das células odontoblastóides sobre os discos de dentina 80

4.8 Manipulação e aplicação do CIVMR 82

4.9 Avaliação do metabolismo celular 84

4.10 Análise da morfologia celular. 86

4.11 Teste de resistência de união - cisalhamento 87

4.12 Tratamento estatístico dos dados 93

5 RESULTADO 96

5.1 Metabolismo Celular 96

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura 98

5.3 Resistência de União - cisalhamento 102

6 DISCUSSÃO 106

7 CONCLUSÃO 123

8 REFERÊNCIAS 125

9 ANEXOS 139

Mendonça AAM. Influência da smear layer e sua espessura na adesão e citotoxicidade de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina [Tese Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade do cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) sobre células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas sob discos de dentina com ou sem smear layer de diferentes espessuras. Além disto, o estudo também investigou se a permanência ou a remoção da smear layer poderia interferir na resistência de união do material com o substrato dentinário. Para isto, 40 discos de dentina com espessura de 0,4mm foram obtidos de terceiros molares humanos hígidos. Após limpeza das superfícies dos discos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, pH 7.2), medidas de condutância hidráulica foram realizadas como forma de padronização da permeabilidade entre os discos. Lixas d'água de granulação 180 e 600 foram utilizadas para a formação da smear layer espessa e delgada, respectivamente. Desta forma, a distribuição dos discos de dentina resultou nos seguintes grupos controle e experimentais: G1*M* - grupo controle; G2*M* – Smear layer Espessa + CIVMR; G3*M* – Smear layer Delgada + CIVMR; G4*M* – Smear layer Espessa Removida + CIV; G5*M* – Smear layer Delgada Removida + CIVMR. Após divisão e posicionamento dos discos em câmaras pulpares artificiais, 50.000 células odontoblástóides MDPC-23 foram cultivadas sobre sua superfície pulpar. Decorridos 48 horas do cultivo, o CIVMR Vitrebond™ foi aplicado sobre a superfície oclusal dos mesmos discos de dentina com ou sem smear layer. Após 24 horas, o metabolismo das células foi determinado através da avaliação da atividade da desidrogenase succínica (MTT assay). A morfologia celular foi analisada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para avaliação da resistência adesiva, outros 40 terceiros molares com dentina oclusal exposta tiveram o Vitrebond™ aplicado dentro das mesmas condições já descritas (com ou sem smear layer). Os grupos experimentais e controle foram assim determinados: G1*R* – Smear layer espessa removida + CIVMR; G2*R* – Smear

layer removida + CIVMR; G3*R* – Smear layer Espessa + CIVMR; G4*R* – Smear layer Delgada + CIVMR. O volume do material aplicado foi padronizado em 1,5mm de altura e 4,0mm de diâmetro, permitindo a realização do teste de cisalhamento. Cada espécime foi posicionado na Máquina de Ensaios Mecânicos MTS e submetidos à velocidade de 0,5mm/min até que se desse a ruptura ou falha do espécime. Os resultados de metabolismo celular foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskall-Wallis complementado pelo teste de Mann-Whitney. Com nível de significância de 5%, diferença significativa foi observada apenas entre o grupo controle quando comparado aos grupos experimentais. Assim, os valores de redução do metabolismo celular foram de 54,85%; 60,79%; 64,12% e 62,51% para os grupos G2*M*, G3*M*, G4*M* e G5*M*, respectivamente. A análise das imagens em MEV revelou substrato dentinário com menor número de células para todos os grupos experimentais, sendo que estas células apresentaram notáveis alterações morfológicas. Para o teste de resistência de união, os valores numéricos obtidos foram submetidos ao teste paramétrico análise de variância (ANOVA). Diferenças significativas não foram observadas entre os grupos G1*R* e G2*R* quando comparados entre si, os quais apresentaram os valores de 7,5 MPa e 7,4 MPa, respectivamente. Para a ausência de smear layer, os valores de resistência de união para os grupos G3*R* e G4*R* foram de 6,4 MPa e 6,7 MPa, respectivamente. Da mesma forma que na presença de smear layer, diferenças significativas não foram observadas entre os grupos G3*R* e G4*R* quando comparados entre si. O fator granulometria da lixa não influenciou de forma significativa nos valores de resistência de união entre os quatro grupos experimentais. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o CIVMR Vitrebond™ aplicado sobre dentina com ou sem smear layer de diferentes espessuras causou notável redução no metabolismo celular das células odontoblastóides MDPC-23. Foi possível concluir também que os diferentes tratamentos da dentina não influenciaram nos valores de resistência de união entre cimento ionomérico avaliado e substrato dentinário.

PALAVRAS-CHAVE: Cimentos de ionômero de vidro, Odontoblastos, Camada de esfregaço, Resistência ao cisalhamento, Metabolismo

Mendonça AAM. Influence of smear layer and its thickness on adhesion and cytotoxicity of resin modified glass ionomer cement. [Tese Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

Abstract

The objective of present study was to evaluate the cytotoxicity of a resin-modified glass-ionomer cement (RMGIC) on odontoblast-like cells MDPC-23 plated under dentin discs when smear layer with different thickness was removed or not. In addition, it was also investigated whether presence or not of the smear layer could change in the bond strength of material on dentin substrate. Forty dentin discs with 0.4 mm thickness were obtained from caries and restoration free human third molars. The hydraulic conductance of all dentin discs was evaluated. One hundred eighty and 600-grit silicon carbide paper were employed to created thick and thin smear layer, respectively. Thereby, the distribution of dentin disc revealed the following experimental e control groups: G1*M* – control group; G2*M* – thick smear layer + RMGIC; G3*M* – thin smear layer + RMGIC; G4*M* – Thick smear layer Removed + RMGIC; G5*M* – Thin smear layer Removed + RMGIC. After adapting the dentin discs in artificial pulp chambers, the odontoblast like cells MDPC-23 (50.000 cells) were plated on the pulpal surface of these discs and incubated for 48 hours. Then the RMGIC Vitrebond™ was applied on the oclusal surface of the dentin discs with or without smear layer. After 24h incubation, the cell metabolism was determined through evaluation of succínic desidrogenase enzime (MTT assay). The cell morphology was investigated by scanning electronic microscopy (SEM). To evaluate bond strength, Vitrebond™ was applied on the oclusal dentin surface of 40 human third sound molars treated as previously reported (with or not smear layer of different thickness). The experimental and control groups were determined: G1*R* – Thick smear layer + EDTA + RMGIC; G2*R* - Thin smear layer + EDTA + RMGIC; G3*R* - Thick smear layer + RMGIC; G4*R* - Thin smear layer + RMGIC. Each specimen characterized by the Vitrebond™ applied on the exposed and treated dentin surface of the third molars was positioned in universal testing machine (MTS) and

submitted to 0.5mm/min speed until failure occurs. The results of cell metabolism were submitted to non-parametric statistical analysis of Kruskall-Wallis complemented by Mann-Whitney test ($p<0.05$). Significant difference was observed only among the control and all experimental groups ($p<0.05$). The percentage of cell metabolism reduction observed was of 54.85%, 60.79%, 64.12% and 62.51% for the groups G2*M*, G3*M*, G4*M* and G5*M*, respectively. Notable morphological alterations with lower number cells was observed for the cells spread of dentin substrate. For shear bond strength test, the values were submitted parametric test of ANOVA. No statistical difference was observed between the group G1*R* and G2*R,* which presented shear bond strength values of 7,5MPa and 7,4MPa, respectively. In groups G3*R* and G4*R*, the shear bond strength values were 6.4 MPa and 6.7 MPa, respectively. No significant difference was observed when all groups were compared. The granulometry factor of silicon carbide paper did not influence significantly the bond strength observed for all experimental groups. It was possible to conclude that Vitrebond™ RMGIC applied on the dentin with or without different thickness smear layer caused notable reduction of cell metabolism of odontoblast like cells MDPC-23. It was also concluded that different treatment of dentin did not shear bond strength between ionomer cement and dentin substrate.

KEYWORDS: Glass-ionomer cement, odontoblast, smear layer, shear strength bond, metabolism .

1 INTRODUÇÃO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) foram desenvolvidos em laboratório e introduzidos na odontologia há mais de 30 anos (Kent, Wilson,[48] 1973). Inicialmente, estes cimentos consistiam basicamente de uma solução aquosa de ácido poliacrílico, o qual reagia com um pó de vidro de fluoraluminosilicato (Hotz et al.[38], 1977). A mistura de ambos componentes resultava num material que combinava boas propriedades mecânicas, adequados valores de solubilidade, e importante característica de liberação de flúor proveniente do silicato. Por outro lado, a solução de ácido poliacrílico contribuía com boas propriedades de adesão à estrutura dentária (Nicholson[58], 1998). Em virtude disto, tanto as propriedades físicas e mecânicas, bem como a liberação de compostos fluoretados do interior de sua massa fizeram dos CIVs um adequado material restaurador e bom agente forrador, onde propriedades biológicas de selamento e ação cariostática para cavidades profundas são consideradas necessárias.

Embora apresentassem interessantes propriedades biológicas e adesivas, outros estudos demonstraram que os CIVs convencionais inicialmente desenvolvidos permitiam curto tempo de trabalho e longo tempo de presa (Nicholson[58], 1998). Estas propriedades indesejadas de manipulação fizeram com que os CIVs convencionais apresentassem limitada aceitação por parte dos profissionais da época. Além disto, estas duas características de manipulação do material tornaram os CIVs convencionais altamente susceptíveis à contaminação

pela água ou que em ambientes com pouca umidade, fenômeno de desidratação do interior da massa ocorresse durante os períodos iniciais da reação química de presa (Cattani-Lorente et al.[13], 1999; Wilson[97] 1990; McLean et al.[55], 1994). Na tentativa de eliminar ou reduzir essas desvantagens, a incorporação de monômeros resinosos e iniciadores sensíveis à exposição de luz visível foi realizada, surgindo, assim, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs) (Wilson[97] ,1990; McLean et al.[55], 1994).

Segundo alguns estudos, os CIVMRs apresentam desempenho clínico superior aos CIVs convencionais (Wilson[97] ,1990; Cattani-Lorente et al.[13], 1999). Quando aplicados sobre estrutura dental sadia, especialmente sobre dentina, os valores de união gerados pela interação dos CIVMRs com o dente se mostraram maiores do que àqueles encontrados para os CIVS convencionais (Hinoura et al.[36], 1986; Sidhu, Watson[79], 1998). Todavia, tem sido relatado que a medida em que há diminuição na espessura do remanescente dentinário (ERD), os valores de resistência adesiva para ambos os materiais ionoméricos sobre dentina reduzem significativamente (Inoue et al.[40], 2001). Esta relação direta entre ERD e valores de resistência adesiva, a qual é desfavorável para os casos de cavidades muito profundas, pode estar relacionada a alguns fatores, tais como: (1) diminuição da área de dentina intertubular e aumento do diâmetro e número de túbulos dentinários (Sidhu, Watson,[79] 1998); (2) aumento da pressão pulpar e a quantidade de água intrínseca (Hinoura et al.[36], 1998); (3) menor concentração de cálcio na dentina profunda quando comparada a dentina superficial (Lin et al.[52], 1992). Como forma de superar estas características inerentes ao substrato

dentinário exposto quando da confecção de cavidades profundas, e assim melhorar a interação dentina/CIVMRs, aumentando os valores de resistência adesiva, tem sido recomendado como protocolo clínico o uso de agentes condicionadores dentinários antes da aplicação dos CIVMRS (Hinoura et al.[36], 1998, Glasspolle et al.[32], 2002).

O objetivo do condicionamento da estrutura dental é remover contaminantes da superfície de esmalte e dentina, além da smear layer (Mitra,[57] 1991; Prati et al.[67], 1992; Titley et al.[94], 1994). O ácido poliacrílico é um dos agentes condicionadores de dentina mais recomendado para o pré-tratamento do substrato dentinário antes da aplicação dos cimentos de ionômero de vidro (Tay et al.[90], 2001). Tem sido demonstrado que este agente condicionador é capaz de remover a smear layer e, através de um tempo limitado de aplicação, permitir que fragmentos deste resíduo dentinário permaneçam na embocadura dos túbulos, mantendo-os ocluídos (Tay et al.[90], 2001). Outros estudos têm demonstrado que a adição de HEMA na composição do líquido dos CIVMRs tem produzido melhores valores de resistência adesiva (Titley et al.[93], 1996; Hitmi et al.[37], 2002). Para alguns CIVMRs, tal como o Vitrebond™, isto parece ser uma característica interessante. Para este material, tanto o HEMA quanto o ácido poliacrílico estão presentes no seu líquido, reunindo assim, os benefícios de ambos agentes químicos.

Diferente dos demais CIVMRs disponíveis no mercado odontológico, o Vitrebond™ não requer um passo separado para condicionamento prévio do

substrato dentinário, uma vez que o ácido poliacrílico está contido no líquido do cimento. Desta forma, quando aplicado sobre dentina, o Vitrebond™ é responsável por modificar e incorporar a smear layer na interface adesiva, além de condicionar a dentina subjacente, funcionando como um cimento de ionômero de vidro auto-condicionante (Watanabe et al.[96], 1994). Da mesma forma que para o Vitrebond™, os adesivos dentinários auto-condicionantes (s*elf-etching*) são aplicados sobre a dentina sem condicionamento prévio das paredes cavitárias com soluções ácidas. Por este motivo, os adesivos auto-condicionantes modificam e incorporam a smear layer na interface adesiva, formando uma camada híbrida diferente daquela observada para os sistemas adesivos convencionais. Nesta nova camada híbrida, uma zona de smear layer hibridizada localizada mais acima e uma zona de dentina desmineralizada localizada mais abaixo são infiltradas pelo primer acídico, o qual é polimerizado in situ (Watanabe et al.[96], 1994). Desta forma, espera-se que nenhuma fenda ou "gap" possa se formar entre a dentina hibridizada, onde houve incorporação da smear layer, e o tecido dentinário subjacente intacto (Kelly[46], 1995). O resultado disto é um procedimento adesivo simplificado que melhora o selamento marginal e a adesão entre o material resinoso auto-condicionante e a dentina. Todavia, alguns estudos têm demonstrado que determinadas características da smear layer, tais como rugosidade, aderência e espessura, podem interferir na resistência adesiva (Wahle, Wendt[95], 1993; Ayad et al.[2], 1996; Dippel et al.[24], 1984; Tay et al.[88,89], 2000; Reis et al.[70], 2005). Uma smear layer espessa poderia se tornar uma barreira impermeável para os materiais auto-condicionantes ou ainda neutralizar sua

acidez através da ação tamponante de seus componentes. Estes fatores poderiam impedir a progressão do material em profundidade, através da smear layer. Conseqüentemente, o material auto-condicionante não teria a capacidade de atingir o substrato dentinário subjacente para promover adequada união resina/dentina (Itou et al.[42], 1994). Alguns estudos têm relatado baixa resistência de união sobre smear layer espessa, quando sistemas adesivos auto-condicionantes são aplicados sobre substrato dentinário previamente preparado (Tani et al.[86], 2001; Koibuch et al.[49], 2001, Kenshima et al.[47], 2006). Por outro lado, outros trabalhos têm demonstrado que a espessura da smear layer parece não influenciar na adesão materiais resinosos com a dentina (Oliveira et al.[61], 2000; Ogata et al.[60], 2001). Da mesma forma, a espessura de smear layer também poderia interferir no processo de adesão do CIVMR Vitrebond™, uma vez que o ácido poliacrílico contido em seu líquido é considerado um ácido fraco quando comparado aos monômeros acídicos incorporados aos primers dos sistemas adesivos. Por este motivo, a realização de pesquisas, através das quais a resistência de união entre CIVMRs e dentina pudesse ser avaliada, quando da aplicação destes materiais resinosos sobre smear layer de diferentes espessuras, poderiam fornecer dados científicos relevantes quanto ao desenvolvimento e estudo de técnicas mais efetivas para a restauração de cavidades dentárias.

Embora o Vitrebond™ seja indicado para ser aplicado sobre dentina sem aplicação prévia de substâncias ácidas, estudos têm demonstrado que a smear layer funciona como um reservatório de bactérias (Brannstrom et al.[10], 1980). Especial atenção tem sido direcionada para a presença de bactérias na interface

dente restauração e seu possível papel na irritação do tecido pulpar. Neste sentido, produtos tóxicos resultantes do metabolismo bacteriano poderiam difundir-se através dos túbulos dentinários e alcançar o tecido pulpar, resultando em danos à polpa dental. Nesta situação específica, a aplicação prévia de substâncias que pudessem remover a smear layer e smear plugs sem alterar a morfologia da dentina, poderia ser considerada um passo clínico efetivo para a melhor interação de material forrador e substrato dentinário. Tem sido demonstrado que a aplicação prévia do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para remoção da smear layer, favorecendo a interação do sistema restaurador a base de resina com o substrato dentinário, poderia resultar em valores de união aceitáveis clinicamente (Cederlund et al.[15], 2001). Uma solução de EDTA a 0,5M é responsável por remover smear layer presente sobre as paredes cavitárias em dentina e no interior dos túbulos dentinários (Calt, Serper,[12] 2002). Foi demonstrado que o EDTA é um agente quelante moderado de pH neutro (Calt, Serper,[12] 2002), o qual produz diferentes efeitos sobre a dentina, dependendo da sua concentração e tempo de contato com o substrato dentinário (Blomlöf et al.[6], 1997). Tem sido descrito que este agente quelante remove a hidroxiapatita seletivamente, preservando a estrutura da matriz de colágeno (Blomlöf et al.[7], 1999). Além disto, estudos prévios têm relatado que esta solução desmineralizante preserva as fibrilas de colágeno da dentina ao longo do tempo, mantendo valores de adesão próximos àqueles encontrados inicialmente após os procedimentos adesivos (Osório et al.[62], 2005). Remoção total de smear layer e smear plug é observada após aplicação de EDTA 0.5M (pH 7.2) sobre a dentina por 30s (Jacques, Hebling,[43] 2005). Quando

isto ocorre, a permeabilidade dentinária aumenta, permitindo a exsudação do fluído dentinário do interior da polpa dental para o meio externo. Nesta situação específica, fluído dentinário pode alcançar o assoalho da cavidade e inibir a adequada polimerização do material ionomérico resinoso. Desta forma, alguns componentes químicos tóxicos presentes na composição dos CIVMRs, tais como monômeros residuais, podem se difundir através dos túbulos dentinários para alcançar o espaço pulpar (Schmalz et al.[74], 1996; Galler et al.[29], 2005). Recentes investigações têm apontado que tais componentes resinosos são capazes de alterar o metabolismo ou danificar o DNA celular, bem como levar células ao processo de morte por apoptose ou ação química direta (Abou et al.[1], 1998; Mantellini et al.[54], 2003). Além disto, componentes inorgânicos liberados de cimentos de ionômero de vidro, tais como íons Zn, podem desencadear efeitos tóxicos para células cultivadas em laboratórios (Stanislawski et al.[85], 1999). Entretanto, poucos dados científicos estão disponíveis na literatura sobre as propriedades biológicas dos CIVMRs quando aplicados sobre a dentina com ou sem exposição dos túbulos dentinários.

De acordo com o avanço dos procedimentos restauradores adesivos, os materiais odontológicos recomendados para forramento cavitário devem apresentar algumas características específicas, as quais determinam o necessário equilíbrio entre suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas (Banditmahakun et al.[3], 2006; Souza Costa et al.[84], 2007). De maneira geral, algumas destas propriedades, tais como adesão ao substrato dentinário e reduzido efeito citotóxico, devem ser obtidas, especialmente quando o agente forrador for

aplicado em cavidades profundas, onde a espessura do remanescente dentinário entre o assoalho da cavidade a polpa é delgado. Desta forma, pode se esperar que efetivo mecanismo de reparação venha a ocorrer, mantendo, assim, a vitalidade de todo o complexo dentino-pulpar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resistência de união

Hinoura et al.[36] (1991) investigaram três cimentos de ionômero de vidro modificados por resina: Vitrebond Light-cured Liner/Base (3M), XR Ionomer (Kerr) e Fuji Lining LC (GC). Cada cimento foi estudado segundo três parâmetros: (1) efeito do tratamento sobre a dentina; (2) efeito do tempo de irradiação; (3) efeito do tempo entre a mistura do cimento e sua fotoatiavação. Superfícies de dentina foram expostas com auxílio de lixa de granulação 240. Após a inserção de cada superfície de dentina em resina acrílica, lixas de granulação 600 foram empregadas para que uma área de dentina de 4mm de diâmetro ficasse exposta. Cada grupo experimental foi dividido de acordo com a forma de tratamento na dentina, tempo de fotoativação e intervalo de tempo entre a mistura do cimento e sua fotoativação. Para o Vitrebond, as melhores formas de tratamento foram observadas quando a dentina foi previamente tratada com Scotchprep e Gluma (EDTA como condicionante). Todavia, para os demais cimentos, apenas o Scotchprep foi responsável por adequados valores de adesão sobre a dentina. Diferente do tipo de tratamento, todos os cimentos experimentais apresentaram bons valores de adesão quando o tempo de fotoativação foi aumentado. Por outro lado, baixos valores de resistência de união foram observados quando os maiores intervalos entre o tempo de mistura e fotoativação do cimento foram executados.

Mitra[57] (1991) avaliou a adesão e as propriedades físicas do cimento de ionômero de vidro Vitrebond™ quando comparado a um cimento convencional, 3M Glass Ionomer Liner. Para isto, dentes humanos e bovinos foram acrilizados em resina autopolimerizável e armazenados em água destilada a 5°C até serem polidos. Lixas d'água de granulação 120, 320 e 600 foram empregadas subseqüentemente para que então os espécimes fossem aplicados sobre uma área de 0,178 cm^2 e então polimerizado por luz pelo tempo de 30s. Para avaliação das propriedades físicas do cimento (Resistência compressiva e resistência de tensão diametral), a mistura do cimento foi aplicada no interior de cilíndros de vidro. Cada amostra foi avaliada imediatamente após (15 minutos após a fotoativação), 1 hora, 1 semana, 1mês e 7 meses. A resistência adesiva para dentina bovina após 24 horas de armazenamento em água foi de 12±3 MPa para o Vitrebond™ e 4±2 MPa para o cimento convencional 3M Glass Ionomer Liner. Para a adesão imediata, os valores registrados foram de 7±2 MPa e 2±1 MPa para Vitrebond™ e Glass Ionomer Liner, respectivamente. Os padrões de falha foram classificados em coesiva na dentina ou no ionômero. Tanto para dentina bovina quanto para dentina humana, elevados valores de adesão foram observados imediatamente e 24 horas após. Elevados valores de resistência compressiva e resistência de tensão diametral foram observados mesmo após longos períodos de armazenamento.

Lin et al.[52] (1992) investigaram a adesão de dois cimentos fotoativados em duas situações distintas: 1) quando reagidos através da reação química; 2) quando fotoativados segundo a recomendação do fabricante. Para analisarem o

mecanismo de adesão de cada cimento, dez amostras de dentina bovina foram preparadas com papéis de carbeto de silício da série de 120-600 de granulação. Sobre a dentina preparada, uma fina camada (0,1mm de espessura) de cada material experimental foi aplicada e fotoativada ou permitida reagir quimicamente. Sobre cada cimento de ionômero de vidro foi aplicado uma camada de adesivo e camadas de resina composta (P-50). Assim preparados, os espécimes foram armazenadas por 24 horas a 37°C, sendo logo após submetidos ao teste de cisalhamento a uma velocidade de 1mm/min. Tanto a superfície de dentina, anteriormente ao tratamento, quanto os padrões de fratura foram analisado em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As superfícies fraturadas também foram analisadas quanto a presença de cálcio, fósforo, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, alumínio, flúor, zinco e silício em espectroscopia eletrônica de raio X e microscopia eletrônica confocal a laser. Os resultados demonstraram a presença de carbono, oxigênio, nitrogênio, cálcio e fósforo na smear layer presente sobre a superfície de dentina. Outros elementos químicos (Si, Al, F e Zn) foram observados quando cimentos de ionômero de vidro foram fotoativados. Maiores valores de adesão também foram observados para o cimento de ionômero de vidro quando fotoativados por luz visível ao passo que baixos valores de adesão apresentaram para os cimentos permitidos reagir quimicamente.

Prati et al.[67] (1992) avaliaram a influência de nove tratamentos da superfície de dentina sobre a resistência adesiva de um novo cimento de ionômero

de vidro polimerizado por luz bem como a morfologia da superfície de dentina tratada. Os seguintes tratamentos foram realizados: solução salina (controle), NaOCl, glicina acídica, EDTA, ácido maleico, ácido maleico mais glicina, ácido poliacrílico, ácido tânico e soluções de oxalato neutra e acídica. A superfície vestibular dentinária foi polida com papel abrasivo de granulação 320, tratado com um dos químicos experimentais, lavada e seca com ar. Amostras cilíndricas de CIV foram então aplicadas sobre a superfície de dentina, armazenadas em 100% de umidade e testada após 24 horas. Observações em MEV demonstraram nenhum efeito do tratamento com solução salina e Hipoclorito de sódio sobre a smear layer, mas houve completa remoção desta estrutura com exposição de fibrilas de colágeno após aplicação de ácido maleico ou ácido maleico mais glicina. Remoção parcial de smear layer ocorreu seguida do tratamento de glicina e com ácido poliacrílico ou ácido tânico. Completa remoção de smear layer foi observada após tratamento com EDTA ou ácido pirúvico. Tratamento com oxalato produziu uma camada de cristais, os quais completamente cobriram toda a superfície de dentina. A resistência adesiva de CIV foi significativamente aumentada somente pelo tratamento com soluções de oxalato.

Titley et al.[93] (1996) examinaram os efeitos do líquido do cimento de ionômero de vidro Vitrebond™ através de observações em imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) sobre a superfície de dentina bovina com respeito a demora no tempo de polimerização e lavagem da superfície com água sob pressão ou através de leves jatos de ar. O efeito da demora de

polimerização da mistura e aplicação do cimento acima de 120 segundos foi também examinada. Os resultados deste estudo demonstraram que o componente líquido do Vitrebond™ reage quimicamente com a dentina de maneira a sugerir uma reação química de efervescência. Esta reação produz "pulgs" no interior dos túbulos dentinários os quais são resistentes ao deslocamento por água sobre pressão ou quando gentilmente aplicada. Similarmente, uma demora na fotoativação tanto da mistura quanto da aplicação do cimento resulta em porosidade na interface dentinária e cimento de ionômero de vidro. Segundo os autores, os achados científicos sugerem que a adesão do Vitrebond™ sobre o tecido dentinário é primariamente química em natureza e que sua resistência mecânica é comprometida se há uma demora substancial na fotoativação.

Gordan et al.[33] (1998) investigaram a resistência adesiva de dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Vitrebond e Fuji Bond LC) e dois sistemas adesivos (Scotchbond Multi-Purpose e Prime Bond 2.1) sobre dentina e esmalte. Assim, 120 molares foram inseridos no interior de anéis fenólicos e cobertos com resina autopolimerizável. Desta forma, lixas d'água de granulação de 240, 400 e 600 foram empregadas para preparação das superfícies de esmalte e dentina. Antes do teste de resistência adesiva, cada espécime foi submetido a ciclos térmicos, oscilando em banhos com temperatura de 5 e 55°C com intervalos de 13 segundos entre eles. Em seguida, os espécimes foram submetidos ao teste de resistência adesiva a uma velocidade de 5mm/min. Segundo os resultados, os maiores valores de resistência adesiva foram encontrados para o Prime Bond 2.1

(27.2) e Scotchbond Multi Purpose (24.6) quando aplicados sobre o esmalte dental. Por outro lado, quando avaliados sobre dentina, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (Vitrebond e Fuji Lining LC) apresentaram valores de 21,7 e 19,4, respectivamente.

Pereira et al.[66] (2000) avaliaram a interação de CIVMR quando aplicados sobre substrato dentinário na presença e ausência de pressão pulpar. Desta forma, 24 molares humanos extraídos por razões ortodônticas foram divididos em dois grupos: I sem pressão pulpar e II com pressão pulpar. Os seguintes materiais experimentais foram investigados neste estudo: Vitremer (3M), Fuji II LC (GC) e Photac-Fil Quick (ESPE). Cada material foi aplicado sobre o substrato dentinário conforme recomendações de cada fabricante. Sobre cada CIVMR, uma resina quimicamente ativada foi permitida ter o seu endurecimento e todo o conjunto armazenado em água destilada a 37°C por 24 horas. Fatias de 1.0±0.1mm^2 de secção transversal foram obtidas e divididas em três subgrupos, cada qual conforme a região dentinária: acima do corno pulpar, no centro da dentina e na periferia da dentina (próximo à JED). A partir disto, os espécimes experimentais foram submetidos ao teste de resistência adesiva. O teste estatístico ANOVA revelou que a resistência adesiva regional foi material dependente. Independente de pressão pulpar, o Fuji LC apresentou menores valores de resistência adesiva quando aplicados sobre os cornos pulpares. Por outro lado, o Vitremer não apresentou diferença de resistência adesiva na ausência de pressão pulpar, porém menores valores foram observados quando este material foi aplicado sobre os

cornos pulpares a 15cm de pressão. Para o Photac Fill, diferenças estatísticas não foram observadas na ausência de pressão, porém declínio significativo de resistência adesiva foi observado para todas as regiões na presença de pressão.

Yap et al.[98] (2003) investigaram a relação do tipo de tratamento do substrato dentinário e tempo de maturação do cimento com a resistência adesiva do cimento de ionômero de vidro modificado por resina sobre a dentina. Desta forma, 42 pré-molares hígidos e livres de cárie tiveram sua superfície cortada a 2mm da fossa mais profunda da face oclusal. Exposta a superfície de dentina, três tratamentos distintos foram executados: (1) sem tratamento; (2) aplicação de ácido poliacrílico; (3) aplicação de ácido fosfórico. Em seguida a cada tratamento sobre o substrato dentinário, espécimes de 3mm de diâmetro por 2 mm de altura foram construídos e submetidos ao teste de resistência adesiva a uma velocidade constante de 0.6mm/min após 1 semana e 1 mês de maturação do cimento. Os grupos experimentais e controles foram corados com solução azul de metileno para melhor visualização no aumento de 40x para identificar os tipos de padrões de fratura. Segundo os resultados, a média de resistência a fratura variou e 3,16 a 5,18 para o período de uma semana, e 5,00 a 14,95 para o período de um mês. Interação significante entre o período e tratamento de superfície foi observada. O condicionamento da dentina com solução de ácido fosfórico foi demonstrado ser a menos efetiva como forma de preparo do substrato dentinário. Por outro lado, o ácido poliacrílico a 20% alcançou adequados valores de resistência adesiva.

Tay et al.[91](2004) investigaram o comportamento de presença de água na interface dentina/cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR). Neste sentido, substratos dentinários úmidos e secos de terceiros molares foram tratados com ácido poliacrílico por 20 segundos e a resistência adesiva foi investigada através do teste de microtração. Além disto, toda morfologia da interface dentina/CIVMR foi analisada com o auxílio de fotografias obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com as fotografias adquiridas, a dentina hidrata revelou a presença da camada de absorção (CA) formada entre a camada híbrida e CIVMR. Por outro lado, em substrato desidratado, os resultados demonstraram não haver formação de CA ao longo da interface. A ausência da CA em substrato seco revelou um número de fraturas prematuras quando os espécimes foram submetidos ao teste de microtração. Nas fotografias de cada espécime, trincas foram observadas através das imagens de MEV. Segundo estudo, a presença de água no substrato dentinário é fator importante para a adequada adesão de CIVMR.

Coutinho et al.[22] (2007) investigaram como a auto adesividade dos CIVMR podem ser explicadas através da união química e se uma interação micromecânica também pode ocorrer entre material e substrato. Para este estudo, Fuji Bond LC (GC), Photac (3M-ESPE) e Vitrebond™ (3M-ESPE) foram analisados quando manipulados segundos as recomendações de cada fabricante. Assim, cada material após a sua manipulação foi aplicado sobre substrato

dentinário equivalente ao terço médio da coroa e armazenados a 37°C por uma semana. Para Fuji Bond LC e Photac, grupos experimentais adicionais foram investigados em função da necessidade de aplicação de condicionadores sobre a dentina previamente a aplicação destes materiais. Os espécimes de cada grupo experimental foram analisados em microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia força atômica (MFA) e caracterização da interface com microscopia eletrônica de varredura-emissão de campo. Os CIV-MR Fuji Bond LC e Photac quando analisados em MET revelaram um camada híbrida de tamanho submicrométrico sobre a qual havia sido depositada uma fase gel. Todavia, a fase gel apresentada pelo Photac apresentou espessura maior do que para o outro material. Para o Vitrebond™, íntimo contato do material com a dentina pode ser observado. Contudo, nenhum padrão de desmineralização parcial nem fase gel foram visualizados para este material. A espectroscopia fotoeletrônica de raio-X revelou a ausência de cálcio e fósforo na dentina sobre a qual o ácido maléico foi aplicado. Por outro lado, altos picos de carbono (C) e nitrogênio (N) foram observados, sugerindo ausência de hidroxiapatita ao redor de fibrilas de colágenas.

2.2 Citotoxicidade e biocompatibilidade

Schmalz et al.[74] (1996) avaliaram um dispositivo modificado para cultura de células disponível comercialmente. Para este dispositivo, discos de dentina bovina na espessura de 500µm foram inseridos no lugar de uma membrana

permeável. Desta forma, cada câmara ficou então dividida em dois compartimentos: superior e inferior. Na parte inferior, células de linhagem fibroblástica L929 foram cultivadas sobre os discos de dentina e incubadas a 37°C pelo período de 24 horas. Decorrido este tempo, os seguintes materiais experimentais foram avaliados quanto à toxicidade: Cimento de fosfato de zinco (Harvard), dois cimentos de ionômero de vidro convencionais (Ketac-Fill e Ketac-Silver), CIV-MR (Vitrebond) e cimento de óxido de zinco e eugenol. Cada material foi permitido ficar sobre discos de dentina pelo período de 24 horas para posterior medida da viabilidade celular e contagem das células. O Cimento de fosfato de zinco não teve nenhum efeito tóxico sobre as células após 24 horas de exposição. Todavia, os CIVs convencionais (Ketac-fill e Ketac-Silver) causaram considerável dano ás células quando comparados com o primeiro material experimental. Menor taxa de sobrevivência celular foi observada tanto para o Vitrebond™ quanto para o cimento de óxido de zinco e eugenol. Segundo os autores, o dispositivo modificado para cultivo celular pode ser uma alternativa para avaliação de toxicidade de materiais experimentais para testes *in vitro*.

McDougall et al.[53] (1998) determinaram a utilidade de uma cultura de células de odontoblastos imortalizadas (MO6-G3) para teste de biocompatibilidade de materiais. Para tanto, o monômero TEGDMA foi empregado para avaliação da atividade mitocondrial de células MO6-G3 quando comparada a uma linhagem de células fibroblásticas já estabelecida. Assim, $1x10^3$ células/well foram cultivadas em pratos de acrílico contendo 96 compartimentos e

permitidas crescer em meio de cultura DMEM devidamente suplementado. As células foram expostas ao monômero resinoso TEGDMA em diferentes concentrações que variaram de $1x10^{-6}$ a $0,5x10^{-3}$ M. Células não tratadas bem como células expostas ao DMSO foram incluídas em todos os ensaios. A citotoxicidade foi avaliada pela determinação da atividade mitocondrial utilizando a aplicação da técnica do MTT. A análise estatística por ANOVA, utilizando o método de Tukey, indicou efeitos tóxicos do TEGDMA para linhagem odontoblástica MO6-G3 em concentrações de $1x10^{-5}$ M. Por outro lado, o monômero não produziu efeitos tóxicos sobre os fibroblastos L929 após 24 horas de incubação em todas as concentrações experimentais. Além disso, as células MO6-G3 foram incapazes de recuperar dos efeitos tóxicos do TEGDMA na concentração de $0,5x10^{-3}$ pelo tempo de exposição de 48 horas. Odontoblastos expostos às concentrações de $1x10^{-4}$ e $0,5x10^{-4}$ de TEGDMA recuperaram 40-50% e 75-80% da atividade mitocondrial, respectivamente, 48 após a remoção do monômero TEGDMA. A atividade respiratória das células L929 expostas a todas as concentrações experimentais de TEGDMA não foi diferente daquelas demonstradas pelo controle após 48 horas de remoção do monômero experimental.

Consiglio et al.[19] (1998) propuseram estudar o efeito de cimentos de ionômero de vidro convencionais (Baseline, Chemfil, Ketac-fill, Ketac Bond) e modificados por resina (Vitrebond™ e Vitremer) sobre a síntese de proteínas de fibroblastos gengivais bem como a influência do pH do meio sobre as mesmas

células no qual os espécimes ficaram armazenados. Os cimentos foram preparados segundo as recomendações do fabricante em moldes de vidro nas dimensões de 4 mm de altura por 8 mm de diâmetro. Além disso, os autores procuram verificar a influência da liberação de íons flúor em meio de cultura contendo os cimentos de ionômero de vidro Vitrebond™ e Ketac-fill. Os cimentos de ionômero de vidro incubados em meio de cultura a diferentes intervalos de tempos determinaram uma rápida queda na síntese de proteínas nos 20 minutos iniciais, mantendo-se num platô constante até o tempo mais longo de exposição (60 minutos). De acordo com a intensidade de inibição da síntese de proteínas, os materiais testados puderam ser divididos em três grupos: grupo A (Ketac Fil e Chem Fil) – redução de 50%; grupo B (Baseline e Ketac Bond) – 75% de redução; e grupo C (Vitrebond™ e Vitremer) – completa inibição.

Geurtsen et al.[31] (1998) avaliaram a liberação de alguns componentes resinosos provenientes de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina e compômeros. Os corpos-de-prova dos materiais experimentais foram confeccionados nas dimensões de 2mm de espessura por 5mm de diâmetro, os quais foram polimerizados por um tempo de 60s a uma distância de 2mm do espécime. A partir disto, os extratos foram preparados para a análise em cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Outros espécimes com as mesmas dimensões foram armazenados em meio de cultura sem a presença de soro fetal bovino. Para o teste de citotoxicidade dos materiais, fibroblastos de linhagem contínua 3T3 foram cultivados em pratos de acrílicos com 96 wells na

densidade de $1x10^4$ células/well. A substância cloreto de difeniliodónio, fotoiniciador presente no material experimental Vitrebond™., foi avaliado quanto à sua citotoxicidade. Logo após 24h de incubação, a viabilidade celular foi determinada com sonda intercalante de DNA H 33342. As análises da cromatografia gasosa e espectrometria de massa demonstraram que, vários componentes dos produtos testados foram liberados em meio aquoso, dentre os quais puderam ser reconhecidas TEGDMA, HEMA e canforoquinona. Quanto aos testes de citotoxicidade, tanto o cimento de ionômero de vidro Vitrebond™ quanto o compômero Dyract Cem apresentaram efeitos severamente tóxicos às células em cultura.

Leyhausen et al.[51] (1998) tiveram como objetivo determinar e comparar a compatibilidade de cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina. Os materiais analisados foram: Ionoseal, Vitrebond™, Compoglass e Ketac Fil Applicap, os quais foram preparados em corpos-de-prova com as dimensões de 2mm de altura por 5mm de diâmetro. Em seguida, vários extratos de cada material foram obtidos em diferentes períodos e incubados junto com fibroblastos gengivais humanos (FGH) e fibroblastos de ratos (3T3). A viabilidade celular e determinação do DNA foi obtida pela coloração da cultura de células com a sonda Hoechst™ 33342. O cimento Compoglass não inibiu o crescimento celular nos ensaios realizados. Os extratos dos cimentos Ionoseal e Ketac Fil não inibiram ou levemente inibiram o crescimento dos fibroblastos gengivais de ratos, ao passo que o extrato do cimento ionomérico Vitrebond

causou severas alterações nestas células. Além disso, o crescimento celular foi severamente ou totalmente inibido pelos extratos do Vitrebond™. Com base nos resultados, os autores puderam concluir que o Vitrebond™ foi o material experimental mais citotóxico. Todos os demais materiais avaliados revelaram excelente (Compoglass) ou boa (Ionoseal e Ketac Fil) compatibilidade celular.

Bouillaguet et al.[9] (2000) investigaram a influência de concentrações sub-letais de HEMA quanto à capacidade de alterar as funções de macrófagos. Assim, macrófagos monócitos humanos THP-1 foram expostos a concentrações de HEMA entre 0-1,5mmol/L por 6 semanas. Proliferação celular foi medida pelo teste de exclusão de azul de trypan. A atividade mitocondrial foi avaliada pelo teste de MTT e o conteúdo de proteína total foi medida utilizando o ensaio do ácido biciconinico. A proliferação dos macrófagos foi inibida em torno de 40-50% por um pouco menos de 0,75% mmol/L após 1 semana de exposição. A inibição da proliferação permaneceu constante após 1 semana. O conteúdo total de proteína aumentou um pouco mais de 80% após duas semanas e permaneceu elevado durante 6 semanas. A atividade mitocondrial das células aumentou 80% após duas semanas, ocorrendo, logo em seguida, sua diminuição. Contudo, a atividade mitocondrial permaneceu significativamente elevada acima do controle durante 6 semanas. Os achados do atual estudo indicam que 6 semanas de exposição dos monócitos ao HEMA alterou proliferação celular e outras atividades em concentrações significativamente baixas do que relatado

previamente. Tem sido mostrado anteriormente que esta é a concentração que se difundi através da dentina.

Engelmann et al.[26] (2002) avaliaram a interação do TEGDMA com o importante redutor intracelular glutationa (GSH). A influência de várias concentrações de TEGDMA (0,5-7,7mM) sobre a viabilidade e conteúdo de GSH de fibroblastos gengivais humanos foi determinada por meio de ensaio de fluorescência monobromobimane. As células foram tratadas com TEGDMA entre 2 e 24 horas. A incubação de fibroblastos gengivais humanos com TEGDMA mesmo que em concentrações subtóxicas rapidamente diminuiu o conteúdo de glutationa intracelular aos níveis de 30-50% do controle dentro das primeiras 2-6h. Contudo, nenhum efeito adverso simultâneo sobre a viabilidade celular foi encontrada. Longos períodos de incubação acima de 24 horas causou um aumento regulatório na concentração de TEGDMA $\leq$ 2,5mM, ao passo que altas concentrações resultaram em queda total de glutationa concomitantemente com a queda na viabilidade celular. Os autores sugerem que a glutationa parece ter um papel importante na proteção e no processo de detoxificação bem como no processo de morte da célula.

Thonemann et al.[92] (2002) propuseram investigar de forma comparativa a resposta de duas linhagens celulares (cultivo primário e linhagem contínua) após exposição a vários componentes de materiais dentários. Assim, células derivadas

da papila dental bovina (PDB), células transformadas com T- antígeno SV4 (CTTA), células transformadas com oncogens E6/E7 (CTE6/E7) e fibroblastos de rato L929 foram expostos a vários componentes de materiais dentários por 24 horas e a citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de MTT. BisGMA, UDMA, TEGDMA, HEMA< HDDM, MMA, canforoquinona (CQ), bisfenol A (BPA) e GMA foram avaliados. Concentrações que permitiram sobrevivência de 50% das células foram calculadas a partir de curvas de respostas. O ranking dos efeitos tóxicos dos componentes de materiais dentários para os quatro tipos celulares foi idêntico. Os valores de TC50 determinados pela linhagem L929 foram consistentes com os achados de outros autores que utilizaram linhagens contínuas. Contudo, as concentrações de compostos resinosos necessárias para elucidar respostas citotóxicas nas várias células foram diferentes. A análise dos valores de TC50 dos compostos resinosos revelou correlação linear entre as linhagens e toda sensibilidade aumentou como se segue: PDB = CTE6/E7< CTTA<L929. A baixa sensibilidade das células primárias e transformadas quando comparadas com a linhagem contínua e linhagem CTE6/E7 indicam a presença de propriedades estruturais e funcionais específicas relevantes in vivo. As diferenças entre CTTA e CTE6/E7 podem indicar modificações da função celular causada por diferentes processos de transformação.

Souza Costa et al.[83] (2003) investigaram a citotoxicidade de cinco cimentos de ionômero de vidro, utilizando para isto parâmetros como metabolismo celular, contagem do número de células e análise da morfologia

celular através de microscopia eletrônica de varredura. Os seguintes materiais experimentais foram testados: Grupo 1: Vitrebond™ (3M/ESPE); Grupo 2: Vitremer (3M/ESPE); Grupo 3: Fuji II LC (GC); Grupo 4: Fuji IX GP (GC); Grupo 5: Ketac-Molar (3M/ESPE). O grupo 6 (controle positivo) foi representado pela resina composta Z-100 sendo que o grupo 7 (controle negativo) foi representado pela solução tampão fosfato (PBS). Doze espécimes para cada material experimental, cujas dimensões eram 2mm de espessura por 4mm de diâmetro, foram preparados em forma circular e colocados no fundo de compartimentos esterilizados (wells). Todos os espécimes foram polimerizados pelo tempo de 40s. A intensidade de luz foi monitorada com o auxílio de um radiômetro durante todo experimento. Células MDPC-23 na densidade de 30,000 células/well foram cultivadas em pratos de acrílico contendo 24 wells cada um. Seis áreas representativas ao redor de cada material experimental foram selecionadas para a contagem celular em microscópio de luz invertido. A atividade metabólica foi avaliada pela atividade de desidrogenase succínica. Os melhores resultados foram obtidos pelos grupos representados pelo Fuji IX GP (grupo 4) e Ketac-Molar (grupo 5). Estes materiais diminuíram o número celular em 29,5% e 32,5%, respectivamente. Além disso, ambos os materiais reduziram o metabolismo celular em 40,3% e 42,5%, respectivamente. Para os grupos Vitrebond™ (grupo 1) e Vitremer (grupo 2) ocorreu redução no metabolismo celular de ordem 74,5% e 75,5%, respectivamente. Além disso, o número de células foi diminuído em 79,1% e 83,9%, respectivamente. O grupo 3 apresentou resultados intermediários. Os autores puderam concluir que tanto Vitrebond™

quanto Vitremer apresentaram severa toxicidade sobre as células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

Costa et al.[21] (2003) avaliaram a resposta do complexo dentino-pulpar de dentes humanos após aplicação de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond^{TM}) ou um sistema adesivo (One Step) em cavidades profundas. Cavidades classe V foram preparadas nas superfícies vestibulares de 26 pré-molares. No grupo 1, as paredes das cavidades foram condicionadas com ácido fosfórico a 32% e o sistema adesivo dentinário (One Step) foi aplicado. Nos grupos 2 e 3, antes do condicionamento ácido, as cavidades foram forradas com Vitrebond^{TM} ou Dycal (cimento de hidróxido de cálcio), respectivamente. Todas as cavidades foram restauradas com resina composta Z100. Os dentes foram extraídos nos períodos pós-operatórios de 5 e 30 dias e foram preparados para a análise em microscopia de luz. No grupo 1, a resposta inflamatória foi mais evidente que nos grupos 2 e 3. A difusão de componentes do material através dos túbulos dentinários foi observada apenas no grupo 1, no qual a intensidade da resposta aumentou com a redução da espessura da dentina remanescente. A presença de bactérias foi evidenciada nas paredes laterais de duas amostras do grupo 2, onde não ocorreu resposta inflamatória ou desorganização tecidual. Baseado nos resultados, os autores concluíram que a aplicação do sistema adesivo One Step não é recomendada diretamente sobre a dentina em cavidades profundas. Nestes casos, as paredes das cavidades devem ser forradas com um material mais biocompatível como Vitrebond^{TM} ou Dycal.

Issa et al.[41] (2004) avaliaram a alteração do metabolismo celular e integridade de membrana quando fibroblastos gengivais humanos foram incubados com variadas concentrações de monômeros resinosos. Depois de dissolvidos em DMSO, os monômeros foram acrescidos ao meio de cultura e incubados com as células em uma densidade de $5x10^3$ células por um período de 24h. Os pratos de acrílicos contendo soluções de MTT e para determinação da liberação de lactato desidrogenase – indicador de integridade da membrana celular - foram lidos a um comprimento de onda de 570nm e 490nm, respectivamente. Após análise dos dados, o BisGMA apresentou-se mais tóxico do que todos os outros monômeros testados. Concentrações baixas de TEGDMA também revelaram diminuição do metabolismo celular e injúria da membrana plasmática quando incubados com células gengivais. Além disso, os autores puderam concluir que o ensaio de MTT foi mais sensível ao experimento do que o teste de avaliação da integridade de membrana celular. Os resultados demonstraram importante relação entre a natureza do monômero quanto ao seu poder citotóxico.

Chang et al.[18] (2005) trataram células S-G e fibroblastos pulpares (FP) com várias concentrações de monômeros, para avaliar o seu efeito sobre crescimento celular, progressão do ciclo celular, nível de glutationa intracelular (GSH) e produção de espécies de oxigênio reativas (EOS). A inibição no crescimento celular induzida por HEMA em FP foi de maneira dose dependente, a

qual pode ser parcialmente explicada por perturbação no ciclo celular. Paralisação na fase G_2/M foi observada após exposição de HPF a 5 e 10mM de HEMA, concomitante com queda de glutationa e produção de EOS. Paralisação na fase S ocorreu quando as células S-G foram tratadas com 2,5 e 5mM, enquanto 10mM de subpicos na fase G_0/G_1 foi notada, indicando o potencial de indução à apoptose. A queda de glutationa foi marcada nas células S-G somente nas concentrações de 5 e 10mM, mas excessiva produção de EOS foi observada nas concentrações de 1 e 5mM, ou menos do que 10mM. Isto sugere que o aumento na produção de EOS não foi principalmente causado pela queda de glutationa. Estes resultados ajudam a definir o mecanismo de toxicidade do HEMA causado nas células.

Galler et al.[29] (2005) investigaram a influência da espessura de dentina sobre a citotoxicidade de alguns materiais dentários. Para isto, células da linhagem SV40 foram cultivadas sobre discos de dentina bovina com diferentes espessuras (100 a 500µm). Sobre a dentina do lado pulpar, a smear layer foi removida através da aplicação de ácido cítrico a 50% por 30 segundos. Os materiais experimentais Syntac Classic, Prompt L-Pop e Vitrebond™ foram aplicados sobre discos de dentina bovina de diferentes espessuras (100, 300 e 500µm). Cada disco de dentina foi inserido no interior de uma câmara pulpar in vitro. Após 24 horas de incubação em câmara pulpar com e sem perfusão, as células viáveis foram avaliadas utilizando o teste de MTT e relacionadas ao material controle não tóxico. Syntac Classic diminuiu significativamente a

atividade celular, independente da espessura da dentina. Para Prompt L-Pop e Vitrebond™ uma influência significativa da espessura da dentina foi encontrada sobre a reação celular. Após a exposição do material controle, leituras fotométricas mostraram nenhuma dependência da reação celular sobre a espessura da dentina. Pode ser demonstrado que a dentina age como uma barreira, diminuindo a citotoxicidade com o aumento da sua espessura. Este efeito está relacionado com o material, mostrando pouca influência para o material não tóxico ou material contendo glutaraldeído.

Ribeiro et al.[71] (2006) examinaram o potencial genotóxico e citotóxico de três diferentes cimentos de ionômero de vidro disponíveis no mercado (Ketac Cem, Ketac Molar e Vitrebond™) pelo ensaio cometa e teste de exclusão pelo azul de trypan, respectivamente. Para isto, tais materiais foram expostos às células de ovário de Hamesters in vitro por uma hora a 37ºC. Os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskall-Wallis. Os resultados demonstraram que o pó do Ketac Molar revelou citotoxicidade somente na concentração máxima avaliada (100µm/mL). Da mesma forma, o líqüido do Vitrebond™ a 0,1% de diluição causou maior dano para a molécula de DNA. Diferenças significativas na citotoxicidade provocada por todos os pós dos cimentos de ionômero de vidro testados foram observados na concentração de 1000µm/mL. Com respeito aos líquidos dos cimentos de ionômero de vidro avaliados, o maior efeito tóxico sobre a viabilidade celular foi produzida a 10%, iniciando na diluição de 0,5% para o

Vitrebond™. Tomados juntos, foi concluído que alguns componentes do cimento mostraram tanto efeito tóxico como genotóxico.

Lee et al.[50] (2006) investigaram a possibilidade da apoptose bem como a mutagenicidade ser mediada por estresse oxidativo. Assim, variadas diluições de três monômeros resinosos (GMA, TEGDMA e HEMA) foram adicionadas ao meio de cultura (DMEM 10% SFB), de fibroblastos V79-4 e células pulpares RPC-C2A por 24 horas. Os efeitos citotóxicos foram medidos por ensaio colorimétrico (MTT). Alterações cromossomais induzidas por monômeros resinosos foram investigadas por contagem de micronúlceos através de citometria de fluxo de células V79-4. Os efeitos dos monômeros resinosos sobre a fragmentação do DNA foi visualizada por eletroforese do gel de agarose do DNA, isolado a partir de células da polpa RPC-C2A, as quais foram tratadas por compostos resinosos. O processo de apoptose induzida por monômeros resinosos foi confirmada pela citometria de fluxo. Todos os monômeros exibiram um efeito tóxico dose-dependente, e o ranking da citotoxicidade baseado sobre o TC_{50} foi GMA>TEGDMA>HEMA. A citotoxicidade induzida pelos monômeros resinosos foi significativamente diminuída pelo co-tratamento com n-acetilcisteína, um antioxidante. Os autores também confirmaram que a genotoxicidade de monômeros resinosos induzira micronúcleos em fibroblastos V79-4 de forma dose-dependente. Similar para os efeitos de citotoxicidade, a n-acetilcisteína reduziu o número de micronúcleo em comparação com aqueles gerados pelos monômeros resinosos. O efeito preventivo da n-acetilcisteína foi também

observado para apoptose induzida pelos monômeros em células RPC-C2A. Um padrão de cauda do DNA, característica de apoptose, foi observado em concentrações tóxicas, mas a n-acetilcisteína bloqueou a fragmentação do DNA induzida pelos monômeros resinosos. As células expostas a 300µM GMA, 7 mM TEGDMA, ou 14mM para 24 horas mostraram um aumento significante em células apoptóticas, enquanto a n-acetilcisteína causou redução em células apopóticas quando comparado ao controle.

Reichl et al.[69] (2006) testou a hipótese que componentes liberados de materiais restauradores alcançam níveis tóxicos em tecidos orais humanos. A citotoxicidade de (co)monômeros HEMA, TEGDMA, UDMA e BisGMA comparado com cloreto de metilmercúrio e o componente cloreto de mercúrio foi investigado sobre fibroblastos gengivais humanos, utilizando dois diferentes sistemas: Teste – XTT modificado e ensaio de H33342 modificado. As células foram expostas a várias concentrações das substâncias experimentais por 24 horas. Todos os monômeros testados e componentes de mercúrio significativamente diminuíram a formação de formazan no teste XTT modificado. Os valores de EC_{50} encontrados para a toxicidade relativa foram: HEMA 1; TEGDMA 3; UDMA 109; BISGMA 133; $HgCl_2$ 887; MeHgCl 2306. Um aumento significativo da toxicidade de monômeros e compostos de mercúrio encontrado no XTT-TEST foi da seguinte ordem: HEMA < TEGDMA < UDMA < BisGMA < $HgCl_2$ < MeHgCl. TEGDMA e MeHgCl induziram principalmente a morte celular por apoptose. HEMA, UDMA, BisGMA e $HgCl_2$ induziram

principalmente a morte celular por necrose. Os resultados deste estudo indicaram que componentes resinosos têm baixa citotoxicidade quando comparados a componentes de mercúrio sobre HGF. HEMA, BisGMA, UDMA e $HgCl_2$ induziram principalmente morte por necrose. Segundo os autores, é improvável que substâncias liberadas de materiais alcancem altas concentrações as quais poderiam induzir a morte celular em condições fisiológicas humanas.

Paranjpe et al.[63] (2007) mostraram que o n-acetilcísteina (NAC) inibe morte celular por apoptose induzida por HEMA e restaura a função de células estromal da polpa dental (CEPD) e células orais. A NAC inibe a toxicidade induzida pelo HEMA através da indução da diferenciação em CEPD desde que os genes para sialoproteína dentinária (DSP), oesteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) e fosfatase alcalina a qual foi induzida durante a diferenciação é também induzida pela NAC. Ao contrário da NAC, a vitamina E e C, as quais são antioxidantes conhecidos, falharam em prevenir a morte celular induzida pelo HEMA. Mais importante, quando acrescidas ao meio de cultura sozinha ou em combinação com HEMA, as vitaminas E e C não aumentaram a expressão de gene para OPN. Além disto, a Vitamina E inibiu o efeito protetor de NAC sobre CEPD. Os resultados relatados neste artigo indicam que a CEPD não diferenciadas tem sensibilidade para morte induzida por HEMA.

Shcweikl et al.[78] (2007) investigaram a hipótese que espécies de oxigênio reativas podem contribuir para a geração de genotoxicidade causada por TEGDMA e HEMA. Portanto, os autores investigaram a formação de micronúcleos em células V79 por ambos os monômeros na presença do antioxidante n-acetilcisteína (NAC), o qual é seqüestrador de espécies de oxigênio reativas. Além disto, a influência do HEMA e TEGDMA sobre o ciclo celular normal foi examinada na presença de NAC. Assim, células V79 foram expostas a crescentes concentrações de TEGDMA e HEMA na presença e ausência de NAC pelo período de 24 horas. A genotoxicidade foi indicada pela formação de micronúcleo. A modificação no ciclo celular foi identificada por citometria de fluxo. Um aumento no número de micronúcleos em células V79 indicou genotoxicidade relacionada à dose induzidas por TEGDMA e HEMA. Contudo, a formação de micronúcleo foi reduzida na presença de 10mmol/L de NAC, indicando o seu efeito protetor. Ausência no atraso do ciclo celular na fase G_2 causado pelo TEGDMA foi observada quando células foram co-tratadas com NAC. Similarmente, a presença de NAC levou a uma reversão no atraso do ciclo celular para cultura de células tratada com HEMA.

Mendonça et al.[56] (2007) investigaram a citoxicidade de diferentes materiais, indicados para aplicação direta sobre substrato dentinário, em dois períodos experimentais - 24 horas e 7 dias. Assim, oitenta amostras foram preparadas em matriz de polietileno com dimensões de 2mm de profundidade por 4 mm de diâmetro dos seguintes materiais experimentais: hidróxido de cálcio,

Vitrebond™, Rely X Luting e RelyX Unicem. As amostras foram colocadas em meio de cultura não suplementado e incubadas pelos períodos de 24 h e 7 dias a 37ºC com 5% de CO_2 e 95% de ar. As células odontoblásticas MDPC-23 foram plaqueadas em Wells e incubadas por 72 horas. Após este período, o meio de cultura completo foi substituído pelos extratos obtidos pelos materiais, e o ensaio de MTT foi executado para avaliar o metabolismo celular. Para o período de 24 horas, os materiais experimentais hidróxido de cálcio, Vitrebond™, RelyX Luting e RelyX Unicem diminuíram a viabilidade celular em 91,52%; 81,14%; 78,17% e 2,64%, respectivamente. Para o período de 7 dias, hidróxido de cálcio, Vitrebond™, RelyX Luting e RelyX Unicem diminuíram a viabilidade celular das células MDPC-23 em 91,13%; 87,27%; 79,04% e 10,51%, respectivamente. Segundo os resultados da pesquisa, o cimento autocondicionante RelyX Unicem foi responsável pelos menores efeitos tóxicos apresentados em ambos os períodos experimentais.

Falconi et al.[28] (2007) estudaram o efeito de baixas concentrações de HEMA sobre fibroblastos gengivais humanos (FGH), investigando modificações na morfologia celular, viabilidade celular e a influência sobre o colágeno tipo I. As células foram expostas a 3mmol/L de HEMA para diferentes períodos de tempo (24h, 72h e 96h). A viabilidade celular foi avaliada pelo MTT e a análise para avaliar diferenças na morfologia celular antes e após o tratamento foi realizada por microscopia eletrônica de alta resolução. A presença e localização do colágeno tipo I foram determinadas por imunoflourescência em FGH tratados

com HEMA pelos mesmos períodos experimentais. A viabilidade das células diminuiu após 72 horas de exposição. Os FGH cresceram em monocamadas e a microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo permitiu observar a preservação da morfologia após 24 horas de tratamento, enquanto eles mostraram uma morfologia alterada após 96 horas. A imunofluorescência demonstrou uma redução de colágeno do tipo I após 96 horas de exposição ao HEMA. A partir destes resultados, os autores concluíram que baixas concentrações de HEMA podem significativamente alterar a morfologia de FGH e interferir com presença da proteína colágeno tipo I.

Demirci et al.[23] (2008) investigaram a citotoxicidade de adesivos dentais através da geração de espécies de oxigênio reativas (EOR), os quais podem contribuir também para o efeito genotóxico in vitro. Para o teste de citotoxicidade, células da polpa humana foram expostas aos extratos de "primers" e agentes adesivos Clearfil SE Bond, ClearFil Protect Bond, Adhese, Prompt L-Pop e Excite por 24 horas. A citotoxicidade dos mesmos materiais foi avaliada através do teste de barreira dentinária utilizando cultura de células em três dimensões. A geração de EOR na monocamada de cultura foi medida após 1 hora de exposição pela citometria de fluxo e a genotoxicidade, como indicado pela formação de micronúcleo, foi determinada em células V79 após 24 horas de exposição. Os "primers" e adesivos dentinários diminuíram a viabilidade celular de maneira dose-dependente. A citotoxicidade do agente adesivo, baseado na concentração a qual causou morte de 50% das células (EC_{50}), foi classificada como se segue:

Excite (0,16mg/ml) > Adhese bond (0,30 mg/ml) > Clearfil Protect bond (0,35 mg/ml) > Clear fil SE Bond (0.37mg/ml) e Prompt L-pop bond (0.68mg /ml). Os primers foram 10 vezes menos efetivos. Em contrapartida, nenhum efeito tóxico foi observado para os adesivos no teste de barreira dentinária. Já por outro lado, todos os adesivos dentais aumentaram a produção de EOR em torno de 5 vezes nas células pulpares de maneira dose-dependente,e novamente, os agentes adesivos foram mais eficientes do que os "primers" dentinários. Finalmente, o número de micronúcleo aumentou seis vezes mais pelo extrato do Adhese primer.

Nicholson, Czarnecka,[59] (2008), descreveram os efeitos biológicos dos cimentos de ionômero de vidro modificado por resina através de uma revisão de literatura. Informações sobre o CIVMR e o monômero hidrofílico HEMA, a substância mais prejudicial liberadas deste material Fo coletada a partir de 50 publicações. Como resultado, os autores encontram que o HEMA é liberado dos CIVMR e tem uma série de danos causados biológicos, os quais vão desde inflamação pulpar até dermatite de contato. Existe, portanto um potencial danoso a partir de CIVMR. Contudo, resultados clínicos, com este material, têm demonstrado resultados positivos.

3 PROPOSIÇÃO

- Avaliar o metabolismo celular e analisar a morfologia das células odontoblastóides MDPC-23, quanto ao possível efeito citotóxico transdentinário de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) quando aplicado sobre a superfície de dentina com ou sem presença de smear layer de diferentes espessuras.

- Determinar a resistência de união entre um CIVMR recomendado para forramento cavitário e o substrato dentinário, quando da ausência ou presença de smear layer de diferentes espessuras.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Manutenção das células MDPC-23 em cultura

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 (Hanks et al.[34], 1998) foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm^2 (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura Dulbecco´s Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 UI/mL e 100 μg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias em incubadora (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) com atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2, 95% de ar e temperatura de 37^oC, até que fosse obtido o número adequado de células para a pesquisa.

4.2 Obtenção dos discos de dentina

Após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CEP, Protocolo (Anexo 9.1), oitenta terceiros molares humanos hígidos foram obtidos junto ao Banco de Dentes da mesma Instituição. Estes dentes foram armazenados em solução de glutaraldeído a 2,5%, na temperatura de 4ºC até sua utilização. Após remoção de restos de ligamento periodontal da superfície

radicular, 40 destes dentes foram preparados para obtenção dos discos de dentina.

Os cortes dos dentes foram realizados com auxílio de uma cortadeira metalográfica ISOMET 1000 (Buehler, Lake Buff, IL, USA) com disco diamantado acoplado (11-4254, 4"x 0,012"/ série 15LC, Diamond Blade, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, USA), sob refrigeração com água. Inicialmente, foi realizado um corte transversal, paralelo à superfície oclusal, aproximadamente no limite mais cervical do sulco vestibular. Em seguida, cortes seqüenciais foram realizados até se obtivesse uma superfície plana em dentina sem a presença evidente de "ilhas" de esmalte (Figura 1).

Após obtenção dos discos de dentina com 0,5mm de espessura, a superfície oclusal de cada um deles foi demarcada com duas ranhuras suaves próximas ao limite amelo-dentinário, realizadas com ponta diamantada esférica (nº 1011 KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), em baixa rotação. Isto foi feito com objetivo de definir, de maneira simples e precisa, as superfícies pulpar e oclusal de cada disco de dentina, onde serão posteriormente cultivadas as células ou aplicado o CIVMR associado às diferentes condições de tratamento da dentina, respectivamente.

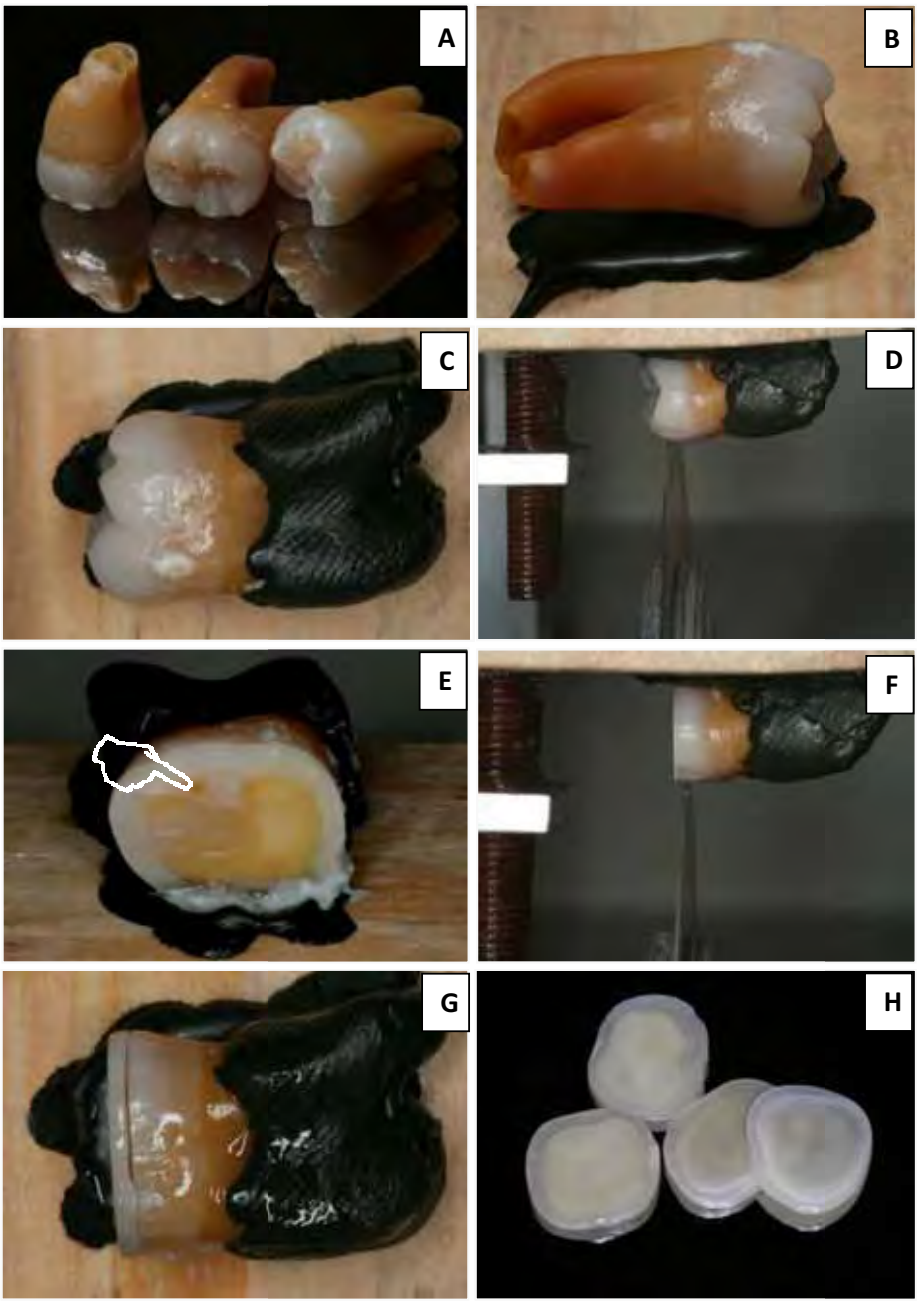


FIGURA 1 - A- Dentes hígidos selecionados para obtenção dos discos de dentina. B e C – Dente fixado com auxílio de godiva de baixa fusão em placa de madeira. D – Disco de diamante posicionado. E – Exposição de dentina superficial com presença de ilhas de esmalte (indicador). F – Disco de diamante posicionado a 1mm do limite do primeiro corte. G – Disco de dentina obtido através do corte aderido sobre a godiva de baixa fusão. H – Discos de dentina obtidos para início do experimento.

Para seleção dos discos de dentina ideais para a realização da pesquisa, as superfícies pulpar e oclusal de cada um dos discos foram cuidadosamente analisadas em Lupa estereoscópica modelo SZ2-ILST (Olympus, Tokyo, Japan). Este procedimento permitiu determinar a presença ou não de "ilhas" de esmalte no lado oclusal e/ou de defeitos resultantes das projeções dos cornos pulpares do lado pulpar (Figura 2).

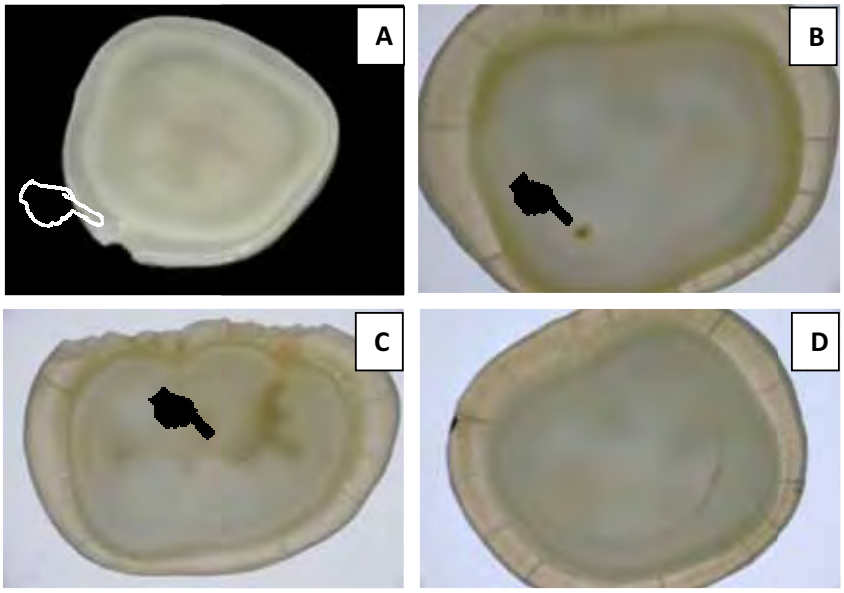


FIGURA 2 - A– Disco de dentina com demarcação (indicador) em sua periferia indicativa do lado olcusal, próximo á junção amelodentinária. B – Disco de dentina com presença de corno pulpar (indicador). C – Disco de dentina com presença de ilha de esmalte (indicador), referente ao fundo de sulcos principal. D - Disco de dentina com características ideais para mensuração da permeabilidade.

Em seguida, os discos de dentina selecionados tiveram suas superfícies regularizadas através de desgastes com lixas d'água número 400 e 600 com movimentos giratórios manuais para cada granulação. Isto foi realizado até que se obtivesse a espessura final de 0,4 mm, a qual foi determinada por meio de

paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mytutoyo, Japan). Todos os 40 discos de dentina selecionados para esta primeira etapa do estudo foram armazenados em PBS (pH 7,4) para que se procedesse a avaliação de sua permeabilidade.

4.3 Determinação da permeabilidade dentinária (condutância hidráulica)

Para se obter uma distribuição homogênea dos discos de dentina dos grupos experimentais e controle, a permeabilidade dentinária foi determinada por meio do cálculo de condutância hidráulica (Lp). Para isto, restos de smear layer foram removidos pela aplicação de 50µL da solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) pelo período de 60 segundos sobre as duas superfícies dos discos de dentina, seguido da lavagem com 5mL de água deionizada estéril (Figura 3). Além disto, tem sido demonstrado que este procedimento proporciona adequado substrato dentinário para adesão e crescimento celular para a realização de testes de citotoxicidade (Costa, Hanks,[20] 1998).

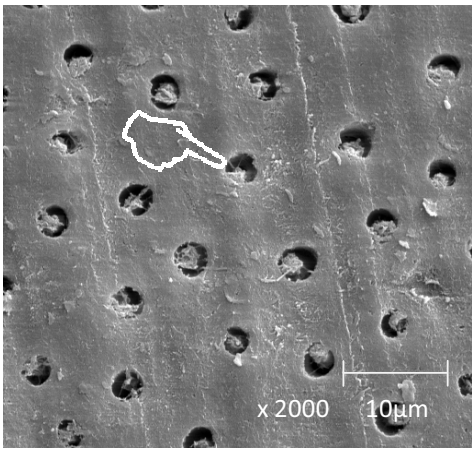


FIGURA 3 - A aplicação de solução de EDTA 0,5M pelo tempo de 60s proporcionou uma superfície de dentina desprovida de smear layer bem como de smear plugs no interior dos túbulos dentinários. Observe a presença de processos odontoblásticos (indicador) no interior dos túbulos dentinários. MEV (Aumento original de 2000x)

A condutância hidráulica representa o volume de fluido forçado através do disco de dentina sob uma pressão hidrostática constante, por unidade de área, por unidade de tempo e por unidade de pressão, segundo a equação:

$$Lp = \frac{Jv}{A.\Delta P.t}$$

Lp. Condutância hidráulica ($\mu L\ cm^2\ min^{-1}\ cm\ H_2O^{-1}$);

Jv. Volume do fluido em μL;

A. área da superfície de dentina em cm^2;

Δ**P**. gradiente de pressão em cm H_2O;

t. tempo em minutos

Lp – é expressa em unidade de μL cm^{-2} min^{-1} H_2O cm^{-1}

n= deslocamento da bolha

$$Lp = n/t$$

t= tempo em minutos

Obtenção da fórmula - (Colaboração e supervisão da Prof. Andréa Posi, graduada em física pela UNICAMP).

Obtenção do Jv:

V= $\pi d^2/4$. 66/66

V= $\pi d^2/4$

V= π. $(1,024)^2/4$

Diâmetro da micropipeta = 18 Gauges = 1,024 mm

Comprimento da pipeta = 66 mm

Jv= n/t. π. $(1,024)^2/4$ (µ L/min)

A= π. $d^2/4$

A= π. $(4,42)^2/4$

A= π. 19,53/4

A= área da dentina, calculada pelo diâmetro do anel *(o-ring)* utilizado para fixar o disco de dentina no dispositivo (câmara pulpar *in vitro*).

Diâmetro interno do anel de vedação *("o-ring")*: = 0,442 cm.

P= 180 cm de H_2O

P= pressão hidrostática

Lp= Jv/A.P = 1/A

Lp= n/t . π.$(1,024)^2/4$. 4/ π. 19,53 . 1/180

Lp= n/t . 1,048576 . 1/3515,4

Lp= n/t . 0,00029828

Lp= 0,0003

Para a determinação da condutância hidráulica e das subseqüentes análises, foi utilizado o método da filtração, descrito por Pashley et al.[64], (1984), onde os discos são individualmente posicionados em dispositivos denominados de câmara pulpar in vitro (*in vitro pulp chamber*, IVPC). Todavia, na presente pesquisa, um sistema semelhante aquele anteriormente descrito foi preparado no Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para testes de condutância hidráulica. Este dispositivo apresenta uma coluna de água de 1,8 metros de altura, correspondendo à pressão de 180 cm de H_2O ou 17,65 Kpa (Figura 4).

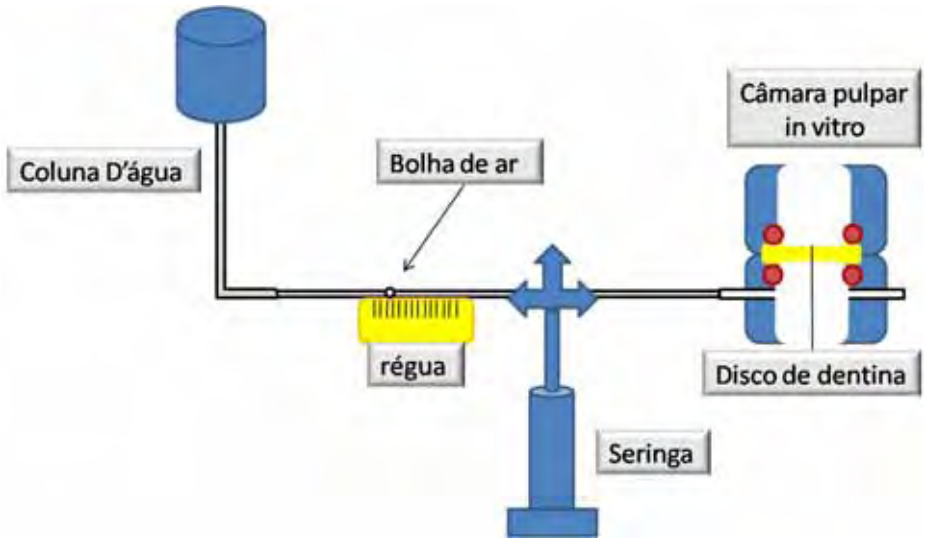


FIGURA 4 - Sistema para análise de condutância hidráulica com pressão hidrostática.

Cada disco de dentina foi posicionado cuidadosamente em uma câmara pulpar desenvolvida especialmente para a medida da permeabilidade (Figura 5).

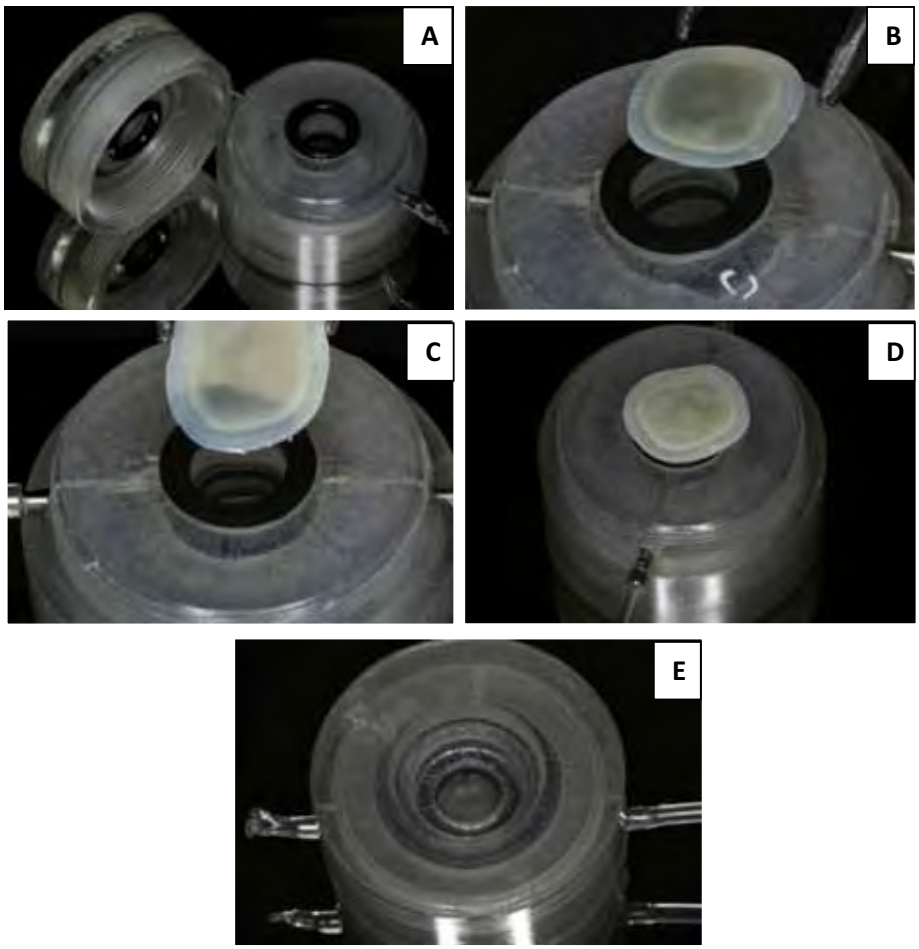


FIGURA 5 - A – Parte superior e inferior da câmara pulpar empregada para estabelecer a permeabilidade dos discos de dentina. B – Disco sendo posicionado na abertura superior do compartimento inferior da câmara pulpar para medição da permeabilidade. C – Água sendo absorvida do disco como forma de evitar formação de bolhas abaixo do disco de dentina. D – Disco corretamente posicionado sobre a abertura superior do compartimento inferior da câmara pulpar. E – Câmara pulpar rosqueada com disco de dentina adequadamente posicionado no seu interior.

Cada câmara é composta por dois compartimentos, os quais são hermeticamente unidos quando rosqueados. Na parte inferior da câmara, há uma cânula metálica por meio da qual circula um fluxo de água submetido a uma pressão de 180 cm de H_20. Após determinada a condutância hidráulica, como descrita acima, os discos de dentina, com médias e desvios-padrão estatisticamente iguais, segundo o teste Kruskal Wallis, foram divididos em seus grupos experimentais e controle.

4.4 Preparo da *Smear layer*

Para cada grupo, os discos de dentina selecionados foram lateralmente desgastados, de forma que o diâmetro final alcançado fosse igual a 8 mm. Estes desgastes foram realizados com ponta diamantada 3118 e 3118 FF (KG Sorensen) em alta rotação, com acabamento em baixa rotação (Figura 6). A redução da área total dos discos de dentina com relação ao seu diâmetro foi realizada para que eles pudessem ser posicionados numa outra câmara pulpar artificial (CPA), a qual foi desenvolvida para realização do teste de citotoxicidade transdentinária.

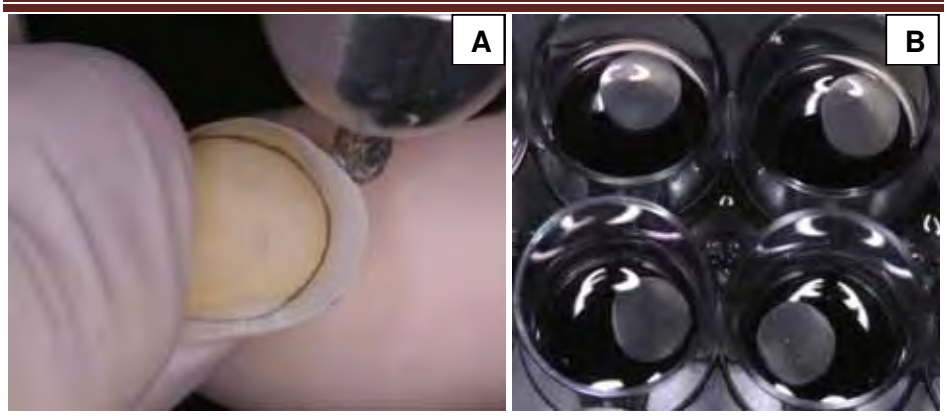


FIGURA 6 - A - Disco de dentina sendo desgastado lateralmente com ponta diamantada 3118 em alta rotação. B – Discos de dentina recortados armazenados em PBS no interior de compartimentos de acrílico individualizados.

Para criação da *smear layer* de diferentes espessuras, a superfície oclusal dos discos de dentina foi submetida a cuidadoso desgaste com auxílio de lixas d'água de granulação 180 e 600 para a formação da *smear layer* espessa e delgada, respectivamente, como descrito na literatura (Oliveria et al.[61], 2000; Tani, Finger[86], 2002).

4.5 Câmara Pulpar Artificial (CPA)

Para a avaliação da viabilidade celular, por meio da difusão transdentinária, foi utilizada uma câmara pulpar artificial (CPA), a qual apresenta 2 compartimentos. No topo do compartimento superior (4 mm de altura), há uma abertura de 8 mm de diâmetro, enquanto que em sua superfície inferior ocorre uma redução da abertura com diâmetro de 6 mm, permitindo o posicionamento adequado do disco de dentina. O compartimento inferior

apresenta perfurações circulares com a finalidade de permitir livre difusão do meio de cultura entre a parte externa e interna do dispositivo (Figura 7).

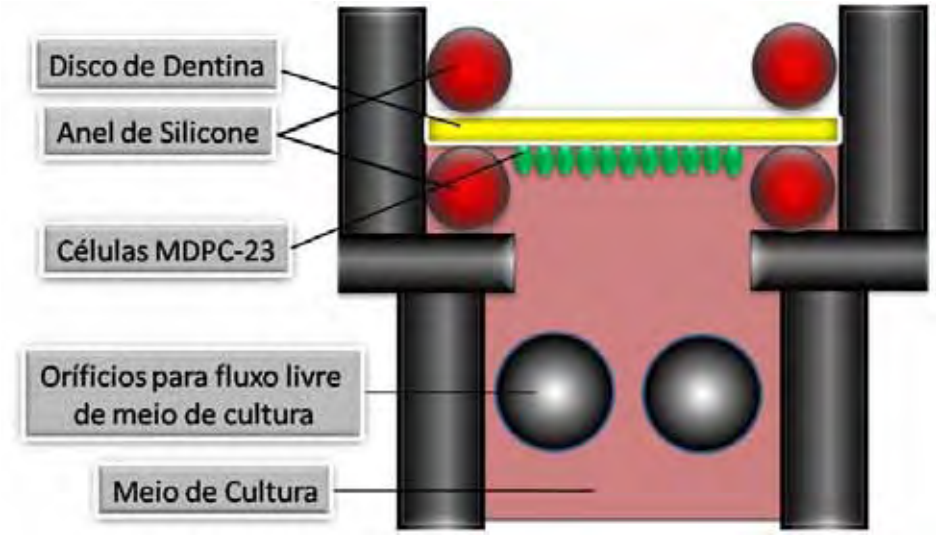


FIGURA 7 - Esquema ilustrativo da câmara pulpar artificial.

Os discos de dentina foram posicionados nos dispositivos entre dois anéis de silicone *o-ring* (Orion – São Paulo, SP, Brasil) com 4,47 mm de diâmetro interno e 1,78 mm de espessura (Figuras 8).

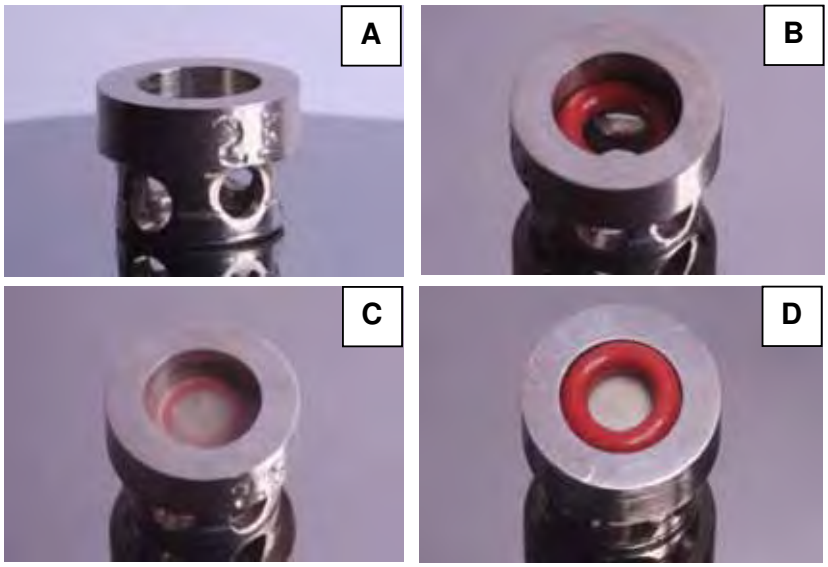


FIGURA 8 - A – Câmara pulpar artificial. B – Posicionamento do primeiro anel de vedação no compartimento superior da câmara pulpar. C - Disco de dentina com superfície oclusal voltada para cima, posicionado sobre o primeiro anel de vedação. D - Segundo anel de vedação posicionado sobre o disco de dentina de tal maneira a manter este disco em posição para receber o material experimental.

4.6 Tratamento da smear layer

Anteriormente à esterilização do conjunto CPA/anéis de silicone/disco de dentina, todos os espécimes foram divididos em grupos experimentais e controle conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre grupos experimentais e controle de acordo com o número de amostras e presença ou não da *smear layer* sobre a dentina

METABOLISMO CELULAR (MTT)		
GRUPOS	*Smear layer*	**Número de Amostras**
Smear layer (controle) (G1*M*)	Presente	**8**
Smear layer Espessa + CIVMR (G2*M*)	Presente	**8**
Smear layer Delgada + CIVMR (G3*M*)	Presente	**8**
Smear layer Espessa + CIVMR (G4*M*)	Ausente	**8**
Smear layer Delgada + CIVMR (G5*M*)	Ausente	**8**
Total	**----------**	**40**

Os grupos foram divididos de acordo com a espessura da smear layer bem como sua presença ou não sobre a superfície oclusal dos discos de dentina. Para os grupos experimentais (G4*M*) e (G5*M*), a solução de EDTA a 0,5M (pH 7,2) foi aplicada sobre o disco de dentina pelo período de 30 segundos para remoção de smear layer (Figura 9), conforme recente estudo (Jacques, Hebling,[43] 2005). Em seguida, a superfície dos discos de dentina foi lavada com água deionizada de forma abundante pelo tempo de 10 segundos com a finalidade de remoção da solução condicionadora. As CPAs, juntamente com os discos de dentina e os anéis de silicone, foram autoclavados individualmente em recipientes de vidro, contendo água deionizada, pelo período de 15 minutos, à 120º C e pressão de 1Kg/força (Galler et al.[29], 2005).

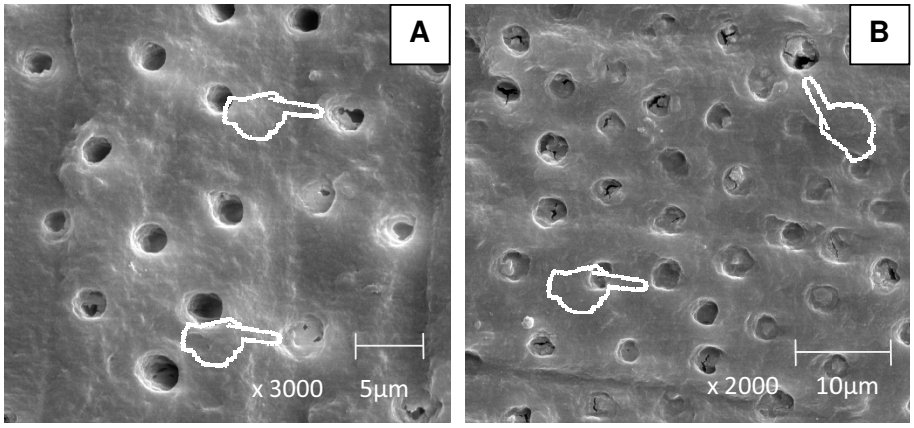


FIGURA 9 - Fotomicrografias representativas da superfície de dentina sobre a qual smear layer de diferentes espessuras foram criadas e removidas pela aplicação de solução de EDTA a 0,5M por 30s. A - Pode se observar túbulos dentinários ocluídos parcial ou totalmente por smear plugs (indicadores) no disco de dentina sobre o qual smer layer delgada foi removida. (MEV aumento original x3000). B - Maior número de túbulos dentinário parcial ou totalmente ocluídos (indicadores) foi observado no disco de dentina sobre o qual a smear layer espessa foi criada. (MEV aumento original x2000).

4.7 Cultivo das células odontoblastóides sobre os discos de dentina

Em capela de fluxo laminar (Bio Protector Plus 12, Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil), as CPAs com os discos de dentina posicionados foram colocadas de maneira invertida nos compartimentos (*wells*) das placas acrílicas esterilizadas de 24 *wells* (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Desta forma, nesta primeira etapa do experimento, a superfície pulpar de cada disco esteve voltada para cima, onde as células MDPC-23 foram semeadas (50.000 células) (Figura 10).

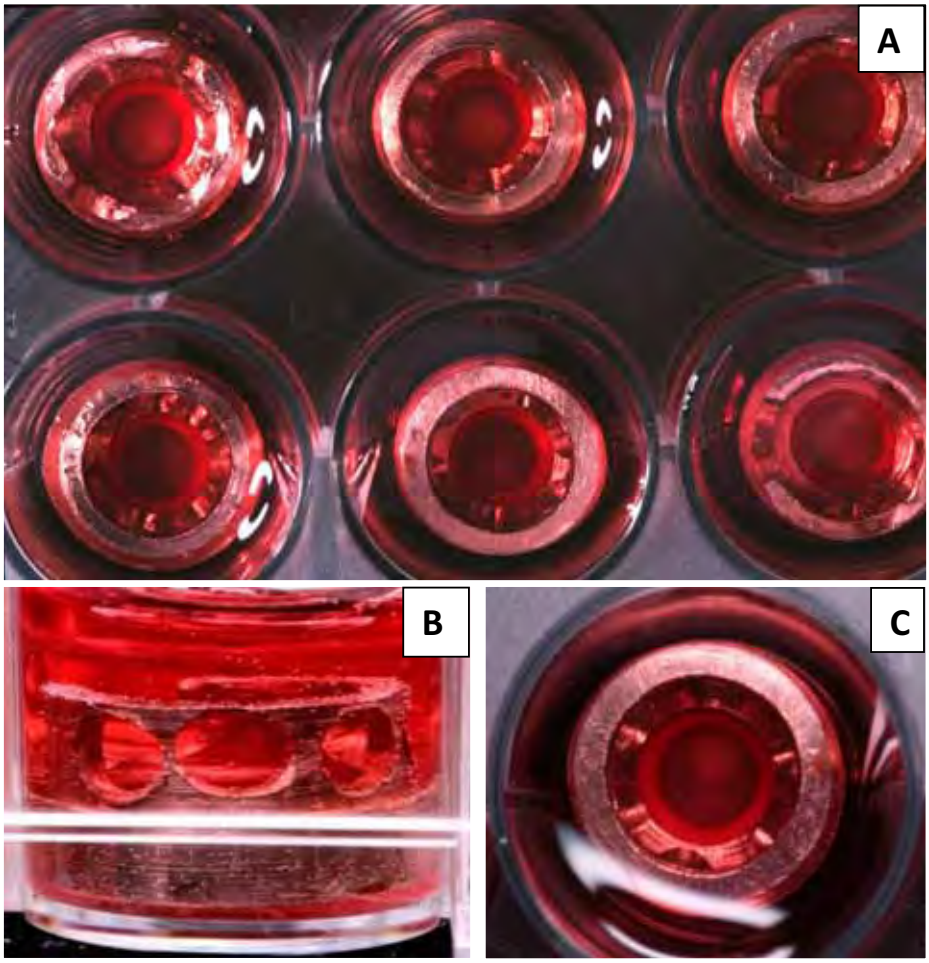


FIGURA 10 - A – Placa de acrílico de 24 wells, onde pode-se observar os compartimentos de acrílico individualizados com as câmaras pulpares imersas em meio de cultura DMEM. B – Vista lateral do compartimento de acrílico individualizado preenchido com meio de cultura DMEM e câmara pulpar com a face oclusal do disco de dentina voltada para baixo. C – Vista superior da câmara pulpar com a face pulpar do disco de dentina voltada para cima, onde foram semeadas as células odontoblastóides MDPC-23.

Em seguida, as placas com os conjuntos CPA/disco de dentina/células foram armazenadas por 48 horas em incubadora a 37ºC com 5% de CO_2 e 95% de ar. Decorrido este período, as CPAs foram reposicionadas nos wells, de tal maneira que a superfície inferior dos discos de dentina, onde as células estavam aderidas para caracterizar uma camada odontoblástica, permaneceu

voltada para baixo, em contato com o meio de cultura DMEM completo (Figura 11). A superfície oclusal dos discos de dentina, a qual permaneceu voltada para cima, foi cuidadosamente lavada com PBS e seca com bolinhas de algodão.



FIGURA 11 - Compartimentos de acrílico individualizados com câmaras pulpares artificiais posicionadas de tal maneira que a face pulpar dos discos de dentina fosse mantida em contato com o meio de cultura DMEM para manutenção das células em condições de viabilidade para o experimento. Note a superfície oclusal dos discos de dentina preparada para receber o material ionomérico (setas).

4.8 Manipulação e aplicação do CIVMR

No interior de uma capela de fluxo laminar vertical, o material experimental foi manipulado de acordo com as recomendações do fabricante e aplicado diretamente sobre a superfície oclusal dos discos de dentina no interior dos anéis *o-ring*. Para a obtenção do CIVMR, uma colher de pó (48,8mg) e uma gota de líquido (38,1mg = 31,75µL), na proporção de 1,4-1,0,

de acordo com as recomendações do fabricante foram dispensadas sobre uma placa de vidro estéril, aglutinadas e manipuladas com o auxílio de uma espátula n° 24. Após preenchimento dos anéis *o-ring* com o CIVMR, este material foi fotoativado por 30 segundos com um aparelho de luz halógena (Curing Light 3000 XL, 3M ESPE, St Paul, MN, USA), cuja fonte de luz era posicionada a uma distância de 3mm do produto (Figura 12). Então, as placas de acrílico, com as CPAs em posição, foram mantidas 24 horas em incubadora de CO_2 na temperatura de 37°C. Após este período, todos os discos foram cuidadosamente removidos das CPAs e as células avaliadas quanto ao metabolismo e morfologia.

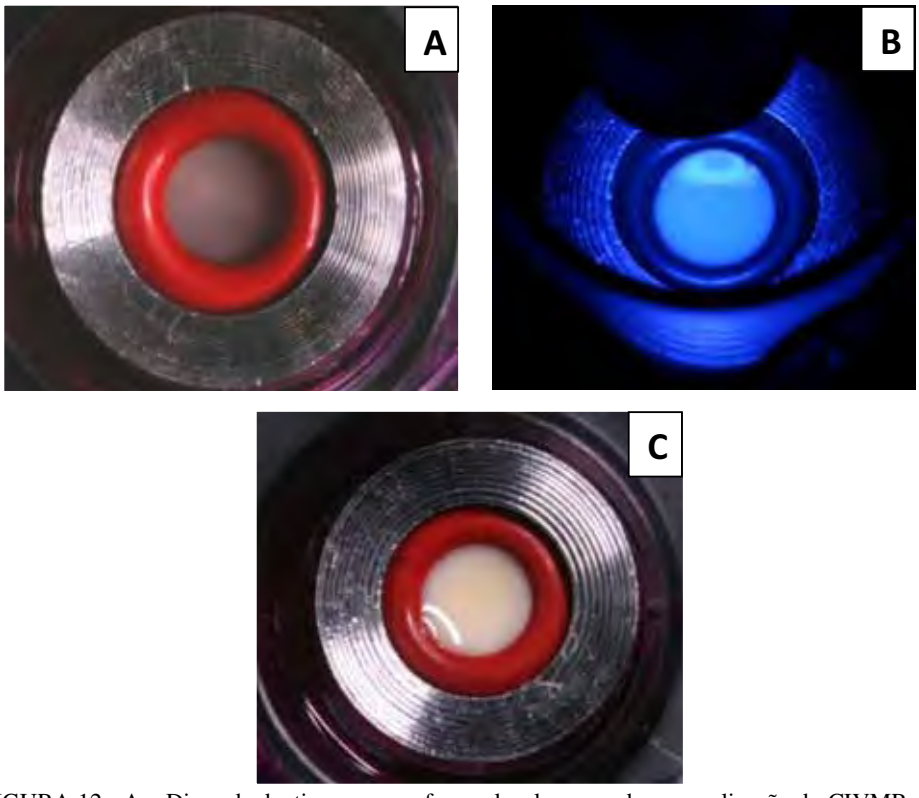


FIGURA 12 - A – Disco de dentina com sua face oclusal preparada para aplicação do CIVMR. B – Emprego de luz halógena para fotoativação do CIVMR aplicado sobre o substrato dentinário. C – Cimento ionomérico modificado por resina fotoativado sobre o substrato dentinário.

4.9 Avaliação do metabolismo celular

Do total de 8 discos distribuídos para cada grupo experimental e controle, 6 foram selecionados para avaliação do metabolismo celular, através da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual indica a taxa de respiração mitocondrial das células. Para atingir este objetivo, foi utilizada a análise colorimétrica do Metiltetrazolium (teste de MTT). Os outros 2 discos de cada grupo foram utilizados para análise em MEV, na qual pode-se avaliar a morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato dentinário.

Para análise da viabilidade celular, as CPAs com os discos de dentina apresentando células e CIVMR nas suas superfícies pulpar e oclusal, respectivamente, foram cuidadosamente removida dos wells e reposicionadas, de maneira invertida, em outras placas de acrílico. Neste momento, a superfície pulpar (onde estavam aderidas as células) permaneceu voltada para cima. Em cada um dos compartimentos onde estavam posicionadas as CPAs, uma solução contendo 900µL DMEM e 100µL da solução de MTT (5mg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), foi aplicada diretamente sobre as células (Figura 13). Após 4 horas de incubação, a mistura do meio de cultura com a solução de MTT foi cuidadosamente aspirada, sendo, posteriormente aplicado sobre os discos 600 µL de solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04N com a finalidade de solubilizar os cristais de formazan presentes. A coloração produzida foi quantificada, considerando-se que as células com atividade mitocondrial normal foram coradas em violeta intenso.

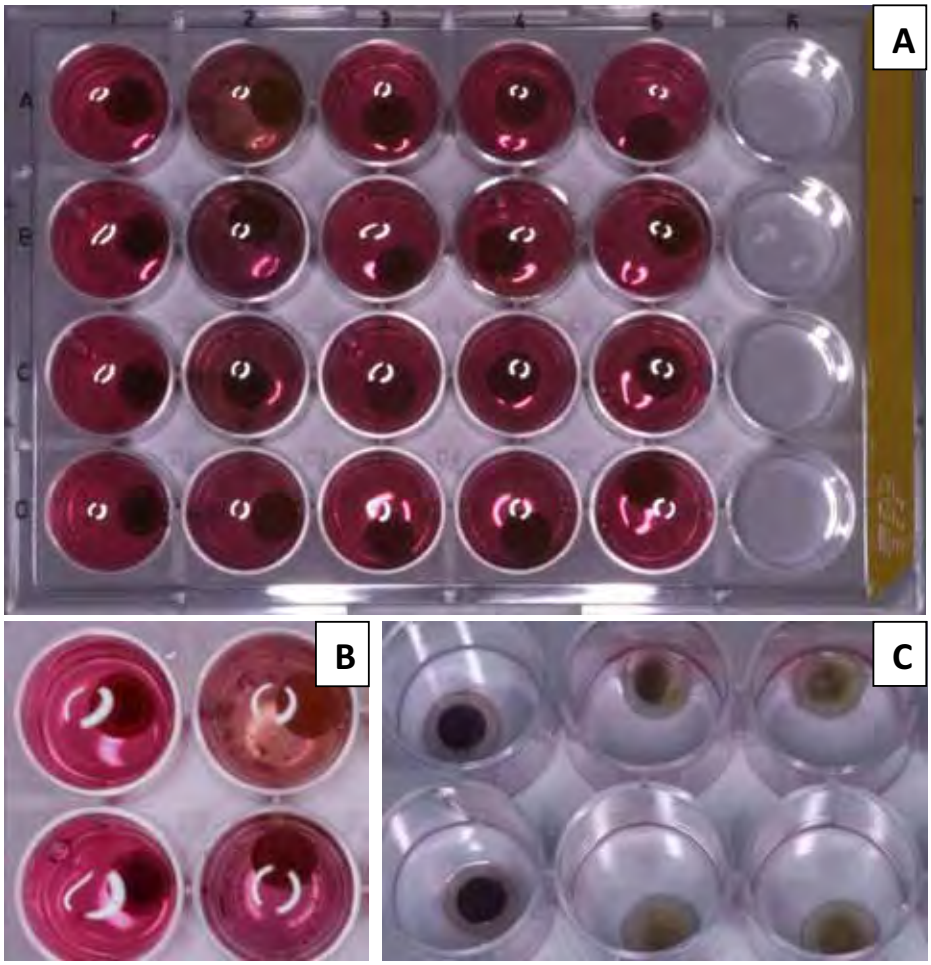


FIGURA 13 - A - Discos de dentina dispostos no interior de compartimentos individualizados, imediatamente após o término do teste de viabilidade celular. B - Detalhe de quatro discos de dentina imersos em meio de cultura. C – Discos de dentina dos grupos controle e experimentais sobre o qual células viáveis foram identificadas pela coloração arroxeada.

A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria em Leitor Universal de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France), num comprimento de onda de 570nm. Para tal finalidade, três alíquotas de 100µL de cada well foram removidas e dispensadas em compartimentos de novas placas de acrílico com 96 wells (Costar Corp., Cambridge, MA, USA).

Para a padronização da leitura, dois compartimentos das placas de acrílico com 96 wells foram preenchidos com 100μL da solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04N. Este procedimento foi realizado com o objetivo de determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular (0% de metabolismo). Por outro lado, o grupo controle caracterizou 100% de metabolismo celular. Os resultados foram obtidos por meio da média em valores numéricos das alíquotas de cada compartimento.

4.10 Análise da morfologia celular.

Dois discos de dentina removidos das CPAs foram imersos por 24 horas em solução fixadora de glutaraldeído 2,5%. Então, as células que permaneceram aderidas à superfície pulpar dos discos de dentina foram submetidas aos seguintes procedimentos:

1. Lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem);
2. Pós-fixação em 200 μL de tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos;
3. Lavagem por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem);
4. Lavagem por duas vezes com 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem);
5. Desidratação em 1 mL de solução com concentrações crescentes de etanol (30%, 50% e 70%, 2 x 95% e 2 x 100%) (30 minutos em cada solução);

6. Imersão por 60 minutos (3 trocas de 20 minutos) em 200 μL de HMDS (1,1,1,3,3,3 – Hexamethyldisilazane 98%, ACROS ORGANICS, New Jersey, USA).

Então, os discos de dentina foram posicionados em novas placas de acrílico com 24 wells, a qual foi fechada e mantida por 12 horas em dissecadora.

Após desidratação e secagem, os discos de dentina foram fixados com esmalte incolor (Risqué, Taboão da Serra, São Paulo, Brasil) e grafite em pó sobre stubs metálicos e cobertos com ouro. As células que se mantiveram aderidas sobre os discos de dentina tiveram sua morfologia avaliada em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – USA Inc., Peabody, MA, USA).

4.11 Teste de resistência de união - cisalhamento

Para o teste de resistência de união, 40 terceiros molares foram posicionados sobre placas de madeira e fixados com godiva de baixa fusão para remoção do terço oclusal da coroa dos dentes. Para isto, utilizou-se cortadeira metalográfica ISOMET 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com disco diamantado acoplado (11-4254, 4”x 0,012”/ série 15LC, Diamond Blade, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, USA), sob refrigeração com água. Em seguida, todos os dentes tiveram a superfície dentinária desgastada com lixas d’água de granulação 180. Este procedimento foi realizado com o objetivo de remover

"ilhas" de esmalte presentes sobre a superfície e para planificar a superfície de dentina (Figura 14).

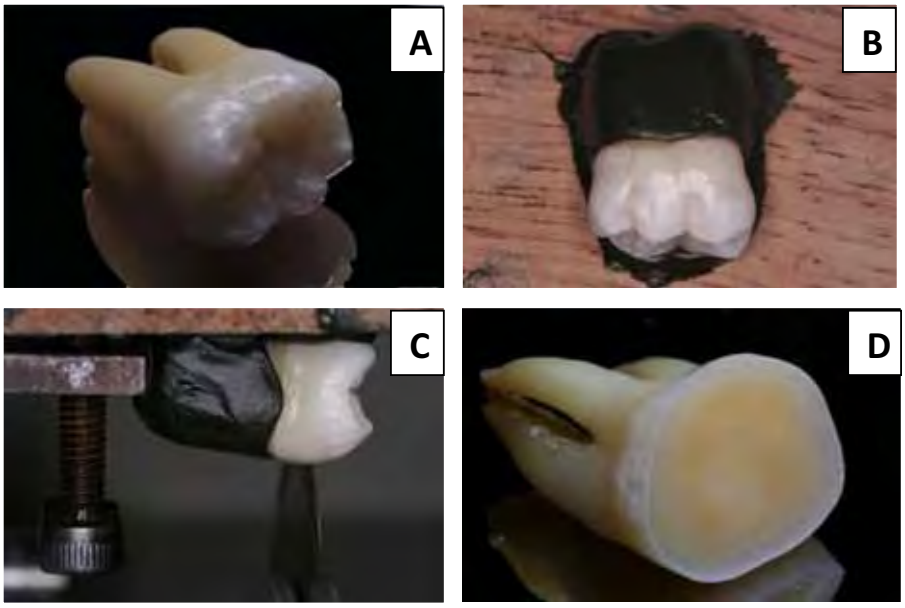


FIGURA 14 - A – Terceiro molar íntegro selecionado para o teste de resistência de união. B – Dente fixado com godiva sobre placa de madeira. C – Início do corte com disco diamantado. D – Vista frontal do substrato dentinário exposto ideal para a realização desta etapa do experimento.

Para o teste de resistência de união, os dentes foram distribuídos em grupos experimentais e controle, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação entre grupos experimentais e controle de acordo com o número de amostras e presença ou não de *smear layer* sobre a dentina

RESISTÊNCIA DE UNIÃO – CISALHAMENTO		
GRUPOS	***Smear layer***	**Número de Amostras**
Smear layer Espessa + CIVMR (G1*R*)	Ausente	**10**
Smear layer Delgada + CIVMR (G2*R*)	Ausente	**10**
Smear layer Espessa + CIVMR (G3*R* – controle 1)	Presente	**10**
Smear layer Delgada + CIVMR (G4*R* – controle 2)	Presente	**10**
Total	**----------**	**40**

Cada dente foi fixado em tubos PVC (Tigre, Rio Claro, SP, Brasil), os quais foram cortados, obtendo-se, assim, tubos menores com dimensões de 4cm de altura por 3cm de diâmetro interno. Após regularização de cada tubo PVC, os dentes com a sua face oclusal voltada para cima, foram fixados sobre placa de vidro, utilizando-se para isto cera derretida (Polidental, Cotia, SP, Brasil). Em seguida, cada tubo de PVC foi posicionado sobre os espécimes dentais e também fixado com cera derretida. Neste momento, resina acrílica quimicamente ativada (Resina acrílica Jet Acrílico Autopolimerizante – Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi dispensada sobre os espécimes, de tal maneira que todo espaço entre o tubo e o dente foi preenchido com o material acrílico. Para extravasamento do excesso de material resinoso, outra placa de vidro foi posicionada e pressionada sobre a abertura superior do tubo de PVC. Após completa reação química de

polimerização da resina acrílica, as placas de vidro superior e inferior foram removidas. Assim, foram obtidos os espécimes os quais eram caracterizados por um tubo de PVC preenchido com resina acrílica, dentro do qual estava incluído o dente (Figura 15).

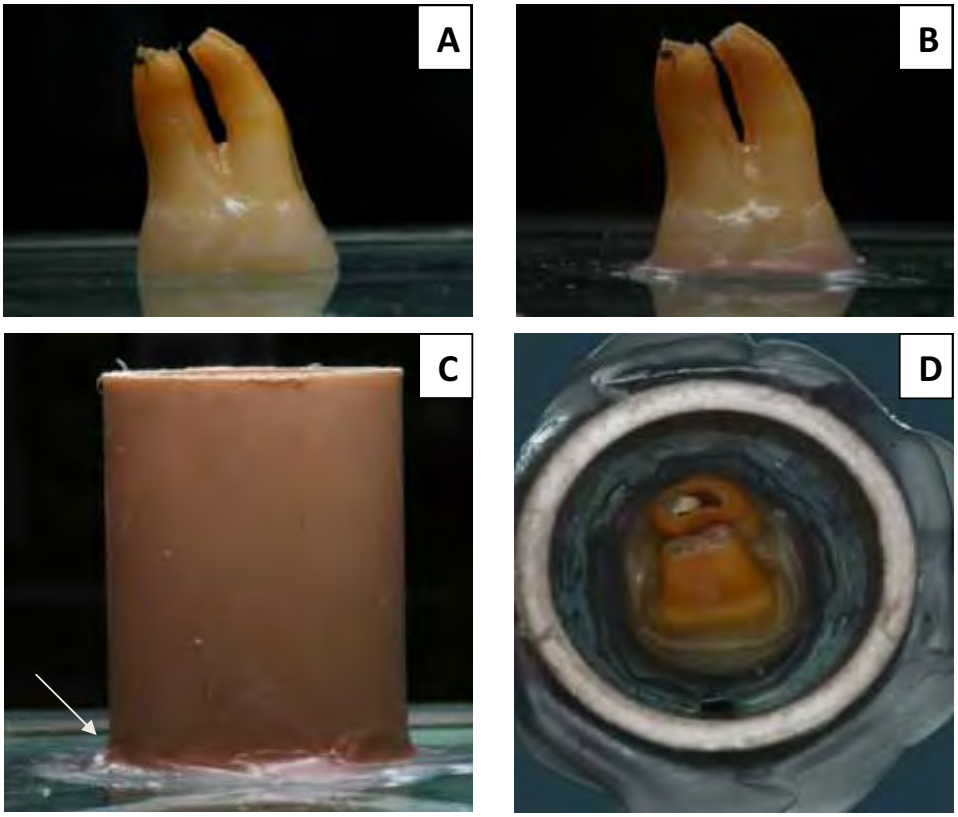


FIGURA 15 - A- Dente posicionado sobre placa de vidro. B – Dente fixado com cera derretida. C – Vista lateral do tubo de PVC adequadamente recortado, posicionado e fixado com cera derretida sobre placa de vidro (seta). D – Vista superior do dente fixado sobre placa de vidro e posicionado no diâmetro interno do tubo de PVC.

Para a criação da *smear layer* de diferentes espessuras, uma máquina politriz, (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) em 200 rpm pelo tempo de 10s, foi utilizada de tal maneira que a superfície de dentina exposta foi friccionada

contra lixas d'água de granulação 180 e 600 para obtenção de *smear layer* espessa e delgada, respectivamente. Após formação da *smear layer*, a superfície dentinária destinada à aplicação do material experimental foi delimitada com fita adesiva (Reforço Plástico, Chamix Imp. e Exp. Ltda, Taiwan). Em seguida, matrizes de polietileno padronizadas, com dimensões de 1,5 mm de altura e 4 mm de diâmetro, foram posicionadas sobre o substrato dentinário para posterior aplicação do material experimental. Para os grupos controle G3*R* e G4*R*, nenhum tratamento prévio com solução ácida sobre o substrato dentinário foi realizado. Para os grupos experimentais G1*R* e G2*R*, a solução de EDTA a 0,5M foi aplicada sobre a dentina com auxílio de aplicadores descartáveis *microbrush* (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) e permitida permanecer pelo tempo de 30 segundos. Em seguida, toda solução de EDTA foi removida através da lavagem da superfície dentinária com água destilada esterilizada pelo tempo de 10s, de acordo com literatura prévia (Jacques, Hebling,[43] 2005). Para remoção do excesso de água, papéis absorventes estéreis foram aplicados sobre dentina até que o último papel apresente-se seco.

O CIVMR foi preparado como anteriormente descrito, seguindo as recomendações do fabricante. Com auxílio de espátula n˚1 de inserção (Duflex, Juiz de Fora, MG, Brasil), o cimento de ionômero de vidro foi aplicado no interior da matriz de polietileno até o completo preenchimento, determinando a formação de um corpo-de-prova semelhante a um disco, o qual apresentou dimensões de 1,5mm de altura por 4mm de diâmetro. Finalmente, o CIVMR

foi fotoativado por 30 segundos, sendo que para isto a fonte de luz (Curing Light 3000 XL, 3M ESPE, St Paul, MN, USA) foi posicionada a uma distância de 3mm do material odontológico.

Realizados todos os procedimentos específicos de cada grupo experimental e controle, todos os espécimes foram armazenados em recipientes plásticos, os quais foram devidamente fechados e mantidos por 24 horas em estufa na temperatura de 37°C. Decorrido este período, os espécimes foram submetidos ao teste de resistência de união através do ensaio de cisalhamento. Para isto, os tubos de PVC, com os dentes incluídos em resina acrílica (espécimes), foram acoplados a um dispositivo apropriado e montados em Máquina de Ensaios Mecânicos MTS (Material Test System 810 – MTS Systems Corporation, Minneapolis, MN, USA). Em seguida, utilizou-se célula de carga de 1 kN (Load Transducter Modelo 66118D – 01) e velocidade do atuador de 0,5mm/min, sendo submetidos a uma força de cisalhamento através de uma ponta de extremidade em forma de cinzel (Figura 16). O movimento foi cessado no momento em que ocorreu a ruptura ou falha dos espécimes, gerando valores numéricos, os quais foram coletados por meio de software (Test Works – Sistema Test Star 2 – MTS Systems Corporation, Minneapolis, MN, USA) instalado num microcomputador Pentium IV. Os valores finais de resistência de união foram calculados, dividindo-se os valores de carga máxima, obtidos em Newton (N), pela área de união dos espécimes, obtidos em mm^2, sendo, portanto, expresso em Mpa.

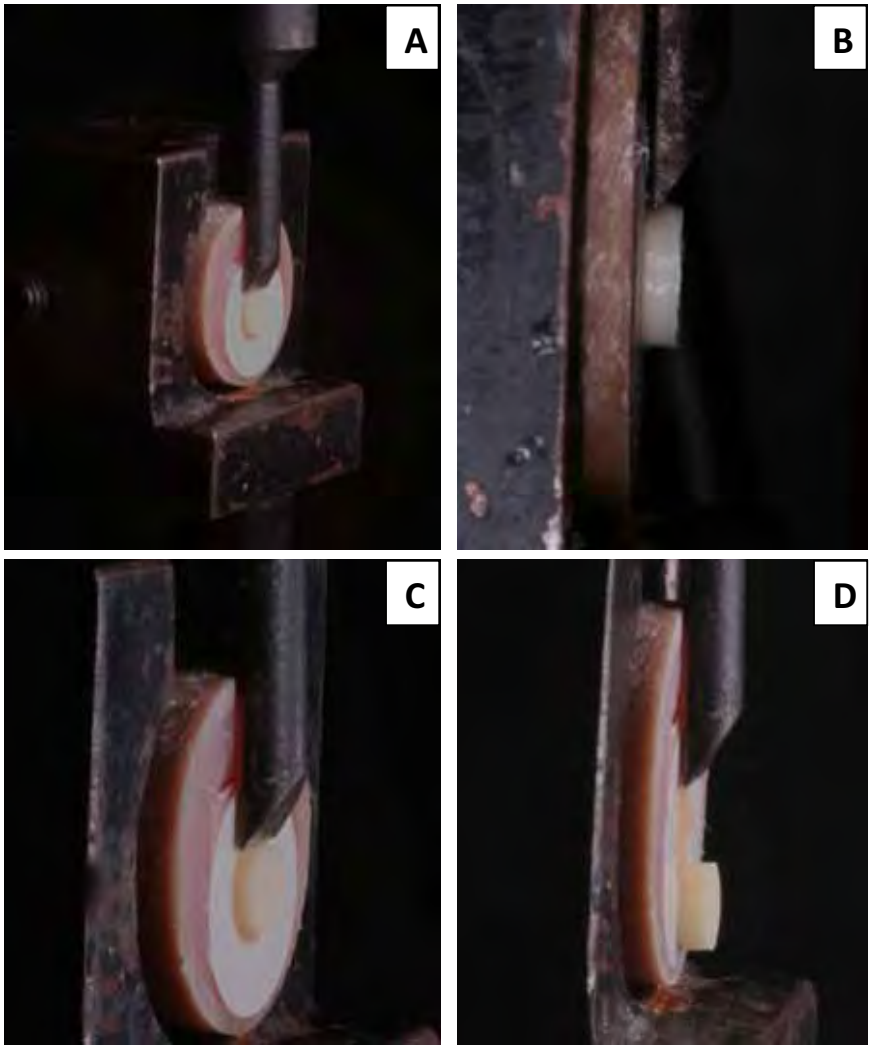


FIGURA 16 - A – Conjunto tubo de PVC + dente no interior do dispositivo metálico adequado para o teste de resistência de união – cisalhamento. B – Cinzel metálico paralelo à superfície do tubo de PVC e perpendicular ao corpo-de-prova de CIVMR. C. Vista lateral do posicionamento do cinzel em relação ao corpo-de-prova. D - Corpo-de-prova após o momento de fratura.

4.12 Tratamento estatístico dos dados

Para os valores numéricos referentes à produção de SDH obtido pelo teste do MTT, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis, complementado pela análise de Mann-Whitney para a comparação múltipla aos

pares. Os valores absolutos de produção de SDH foram convertidos em porcentagem e diminuídos de 100% (grupo controle) para se obter os valores percentuais de redução do metabolismo celular.

Os valores obtidos pelo teste mecânico de resistência de união foram submetidos ao teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA).

Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADO

5.1 Metabolismo Celular

Dados descritivos para a variável condutância hidráulica e produção de SDH estão apresentados na Tabela 3 e Figura 17. Devido à distribuição não normal dos valores de produção de SDH (Komolgorof-Sminorv, $p<0,05$) testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram aplicados.

Tabela 3 - Mediana dos valores de condutância hidráulica e atividade da enzima desidrogenase succínica (SDH) segundo os grupos

Grupos	N	Desidrogenase Succínica (P25-P75)*	Condutância Hidráulica
Controle (G1*M*)	6	0,1803 (0,1720-0,1885)[a]	0,0024 A
Smear Layer Espessa (G2*M*)	6	0,0814 (0,655-0,1053)[b]	0,0021 A
Smear Layer Delgada(G3*M*)	6	0,0707 (0,649-0,772)[b]	0,0025 A
Smear Layer Espessa + EDTA (G4*M*)	6	0,0647 (0,599-0,691)[b]	0,0021 A
Smear Layer Delgada + EDTA (G5*M*)	6	0,0676 (0,623-0,727)[b]	0,0027 A

*Grupos com letras iguais representam não haver diferenças estatisticamente significantes (Mann-Whitney, $p<0,05$).

Como o teste estatístico de Kruskal-Wallis demonstrou haver diferença entre os grupos experimentais e controle ($p<0,05$), o teste de Mann-Whitney foi

aplicado para identificar as diferenças quando os grupos foram comparados dois-a-dois.

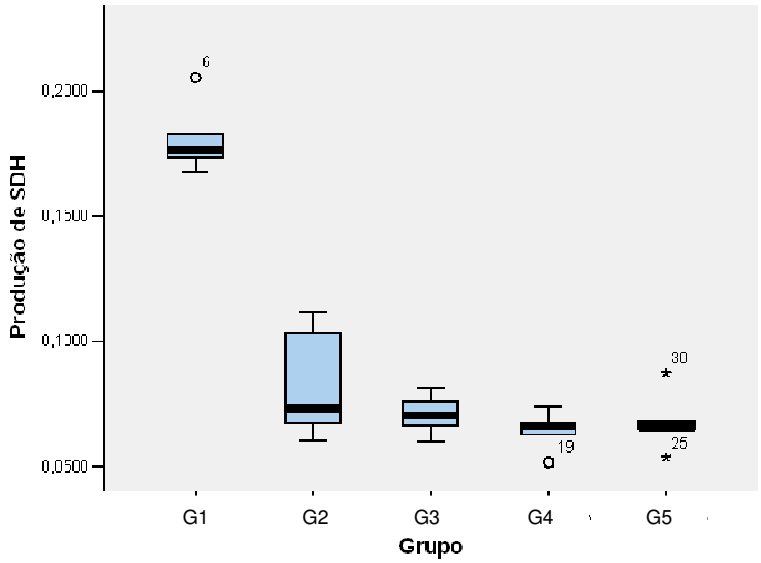


FIGURA 17 - Gráfico box plot ilustrativo de produção de SDH dos grupos experimentais e controle

O grupo controle apresentou a maior produção de SDH (100% de metabolismo celular). Segundo o teste estatístico de Mann-Whitney, diferenças estatisticamente significantes foram observadas para os grupos experimentais G2*M*, G3*M*, G4*M* e G5*M* quando comparado ao grupo controle G1*M* (Tabela 3). Quando observados separadamente do grupo controle, os grupos experimentais G4*M* e G5*M*, apresentaram os menores valores de produção de SDH, seguido pelos grupos aonde a smear layer não foi removida (G2*M* e G3*M*). Apesar disto, diferenças estatísticas não foram observadas entre os grupos experimentais quando comparados um a um.

Os valores percentuais de redução na produção de SDH estão representados graficamente na Figura 18. Dessa forma, quando o CIVMR foi

aplicado sobre disco de dentina coberto com smear layer espessa ou delgada, os valores percentuais de redução do metabolismo celular foram de 54,85% e 60,79%, respectivamente. Quando smear layer espessa e delgada foram removidas através da aplicação da solução de EDTA a 0,5 M por 30 s, os valores percentuais de redução para produção de SDH se elevaram para 64,12% e 62,51%, respectivamente.

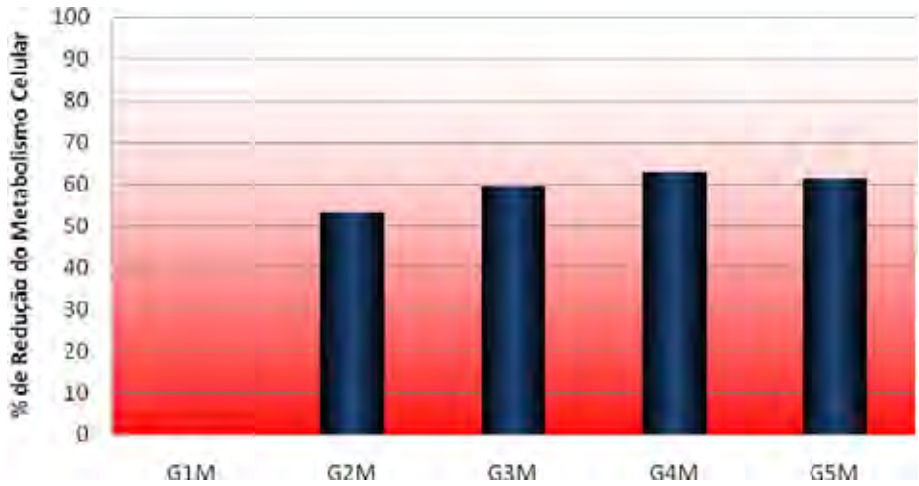


FIGURA 18 - Gráfico de barras ilustrativo da taxa percentual de redução da produção de SDH de acordo com os grupos controle e experimentais.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para cada grupo experimental e controle, duas amostras representativas foram preparadas para a análise da morfologia das células MDPC-23 em microscopia eletrônica de varredura. Assim, pôde-se observar que no grupo controle (G1*M*), um grande número de células permaneceu aderido à superfície pulpar dos discos de dentina (Figura 19). Estas células, as quais estavam próximas

de confluência, apresentavam amplo citoplasma, o qual recobria praticamente toda superfície de dentina. Notável atividade de mitose celular foi observada.

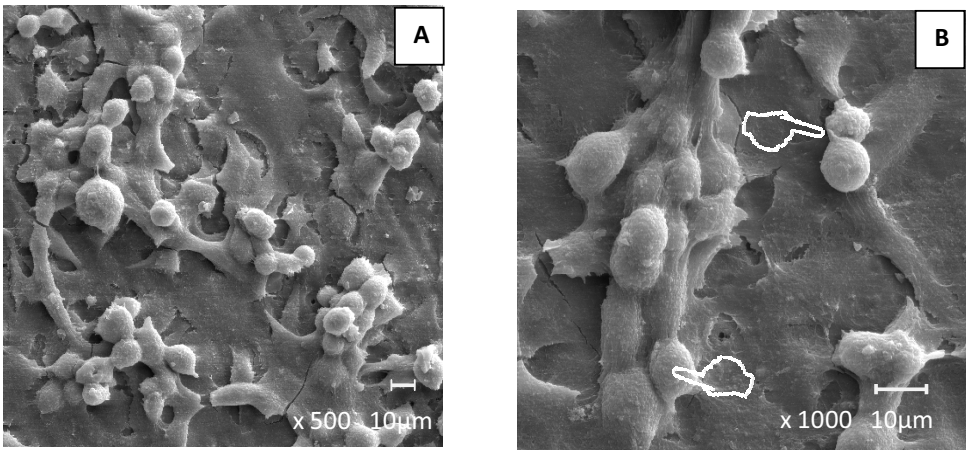


FIGURA 19 - A - Fotomicrografia representativa do grupo G1*M* (Controle). Observe as numerosas células MDPC-23 recobrindo todo substrato dentinário sobre o qual elas haviam sido cultivadas. MEV (aumento original x500). B - Detalhe das células odontoblástóides em atividade mitótica (indicador). MEV (aumento original x1000).

Diferente do grupo controle, menor número de células MDCP-23 foram observadas sobre o disco de dentina para o grupo experimental G2*M*. Estas células MDPC-23 apresentavam-se alongadas ou arredondadas, emitindo alguns finos e longos prolongamentos citoplasmáticos, os quais pareciam ser responsáveis pela sua aderência sobre o substrato dentinário (Figura 20). Esta redução no número de células resultou na exposição de amplas áreas de dentina tubular.

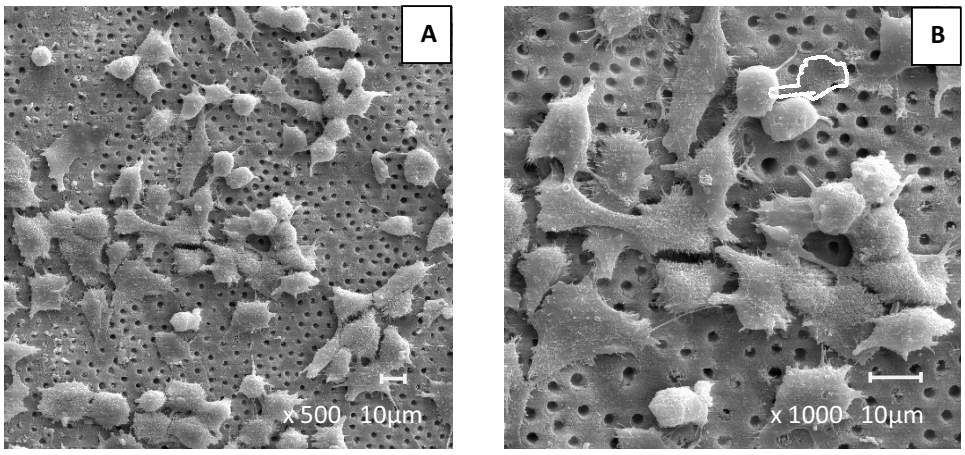


FIGURA 20 - Fotomicrografia representativa do grupo G2*M* (Smear Layer Espessa): A - Reduzido número de células MDPC-23 permaneceu aderido sobre o substrato dentinário. Note amplas áreas de exposição de dentina tubular. MEV (aumento original x500). B – Detalhe da figura anterior. Notável contração do citoesqueleto das células (indicador) causou diminuição de seu tamanho, sendo que esta alteração morfológica das células associado à morte de outras que se deslocaram do substrato, resultou em ampla exposição de dentina. MEV (aumento original x1000).

Para o grupo onde a smear layer delgada foi criada (G3*M*), foi observado um grande número de células com morfologia arredondada, as quais se organizavam em vários grupamentos espalhados pelo substrato dentinário. Assim, como observado para o grupo G2*M*, amplas áreas de dentina não recobertas por células se apresentaram expostas (Figura 21).

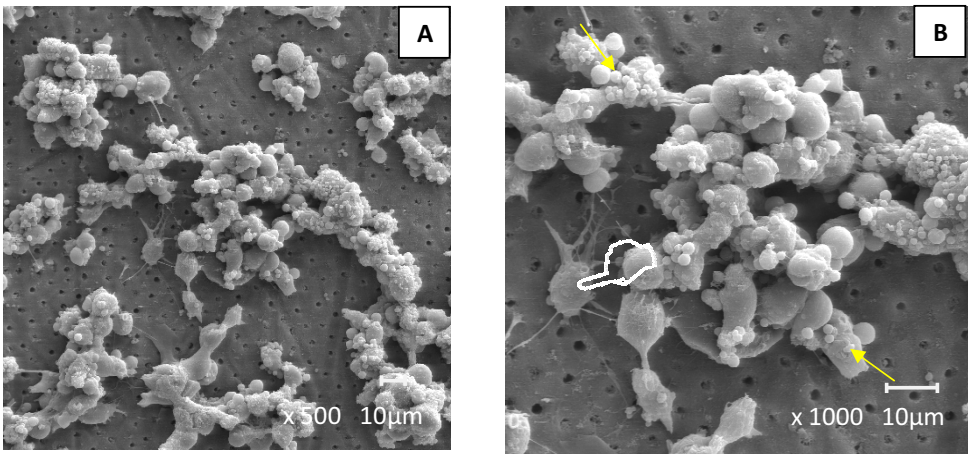


FIGURA 21 - Fotomicrografia representativa do grupo G3*M* (Smear Layer Delgada). A - As células MDPC-23, de morfologia arredondada, estão organizadas em grupamentos sobre a dentina. MEV (aumento original x500). B - Detalhe da figura anterior. Note que algumas poucas células arredondadas exibem finos prolongamentos citoplasmáticos, os quais parecem aderí-las ao substrato (indicador). Alguns prolongamentos contraídos determinaram a formação de pequenas estruturas granulares sobre a membrana citoplasmáticas das células (seta). MEV (aumento original x1000).

No grupo G4*M*, as células MDPC-23 apresentaram morfologia similar àquelas apresentadas para células cultivadas no grupo G3*M*. Menor número de células também se encontrou presente sobre este substrato, tendo, por conseguinte, exposição de grande área do substrato dentinário (Figura 22).

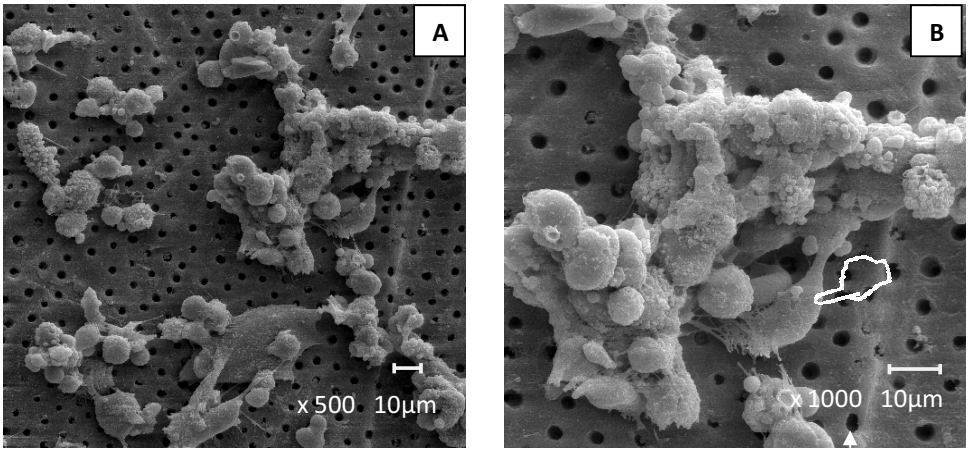


FIGURA 22 - Fotomicrografia representativa do grupo G4*M* (Smear Layer Espessa Removida). A - Observe a presença de alguns grupamentos celulares. MEV (aumento original x500). B - Maior aumento da figura A, onde podem ser observadas poucas células com citoplasma preservado (indicador). MEV (aumento original x1000).

Assim como descrito para os grupos G3*M* e G4*M*, amplas áreas de substrato dentinário livre de células puderam ser observadas no grupo G5*M*. As células arredondadas se organizaram em grupamentos espalhados sobre a dentina (Figura 23). Para este grupo, algumas estruturas alongadas, características de restos de prolongamentos citoplasmáticos de células mortas que se deslocaram do substrato, foram observadas.

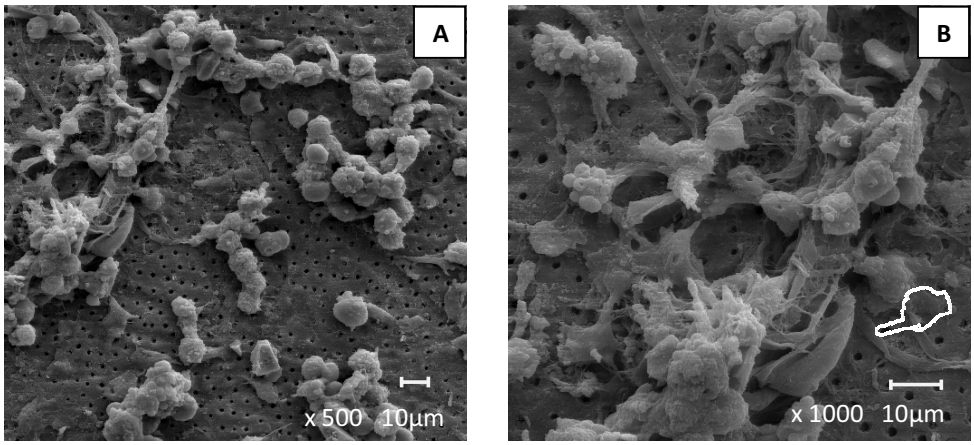


FIGURA 23 - Fotomicrografia representativa do grupo G5*M* (Smear Layer Delgada Removida). A - Presença de células agrupadas em áreas sobre o disco de dentina. Perto de nódulos epitelióides, restos celulares puderam ser visualizados ocluindo a abertura dos túbulos dentinários (indicadores). MEV (aumento original x500). B - Em maior aumento pode ser observado finos prolongamentos citoplasmáticos e restos celulares (indicador). MEV (amento original x1000).

5.3 Resistência de União - cisalhamento

Os valores referentes à variável resistência de união demonstraram uma distribuição normal ($p>0,05$). Assim, as médias (Tabela 4) obtidas a partir dos

valores de resistência de união foram submetidas ao teste estatístico análise de variância (ANOVA) a um critério fixo (tratamento da dentina x granulometria da lixa). De acordo com o teste, diferenças significativas não foram observadas tanto para o fator lixa quando para o tratamento da dentina.

Tabela 4 - Valores de resistência de união (desvio-padrão) obtidos para dentina tratada com EDTA e sem EDTA previamente preparada com lixa de duas granulações diferentes

TRATAMENTO	Granulometria da Lixa	
	180	600
Sem EDTA	**7,5 (±2,1)**	**7,4 (±1,6)**
Com EDTA	**6,4 (± 1,3)**	**6,7 (±2,0)**

As médias de resistência de união de cada grupo experimental foram representadas de forma ilustrativa através do gráfico de barras (Figura 24).

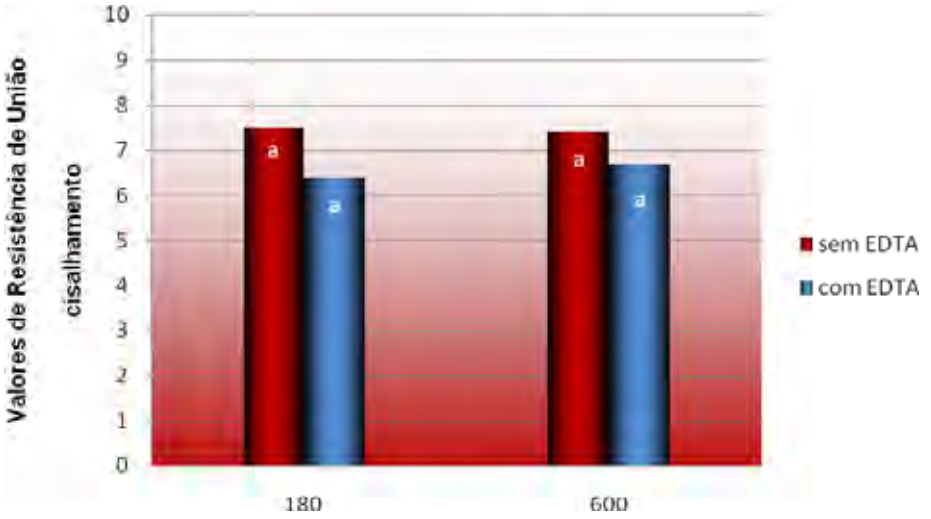


FIGURA 24 - Gráfico de barras ilustrativo das médias dos valores de resistência de união para os grupos de lixa 180 e 600 com e sem aplicação da solução EDTA a 0,5M. Letras iguais representam não haver diferença significativa entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Apesar de pesquisas in vivo utilizando dentes de animais e seres humanos fornecerem dados científicos importantes para as diferentes áreas do conhecimento dentro da odontologia, vários fatores dificultam as realização destes experimentos tais como: 1 - questão ética, 2 - alto custo; e 3 - longo tempo para execução. Desta maneira, diferentes protocolos in vitro de cultura celular têm sido aplicados para avaliar o potencial citotóxico de materiais restauradores e forradores (Huang et al.[39], 2002, Ribeiro et al.[71], 2006). Estes testes laboratoriais têm se mostrado de fácil execução, baixo custo, podendo ser conduzidos sob condições controladas, além de fornecer interessantes informações científicas, as quais são capazes de elucidar, pelo menos em parte, o mecanismo de toxicidade dos materiais forradores e restauradores (Geurtsen et al.[30,31], 1998).

Diferentes linhagens celulares têm sido utilizadas para avaliar o potencial tóxico apresentado pelos materiais capeadores e restauradores (Mantellini et al.[54], 2003; Galler et al.[29], 2005). Muitos estudos têm empregado cultura de células primárias, as quais são obtidas a partir do próprio tecido a ser investigado (Thonemann et al.[92], 2002). Tem sido relatado que este tipo de cultivo celular pode ser melhor correlacionado às situações clínicas, posto que a resposta obtida pelas células primárias cultivadas podem ocorrer de maneira similar ao tecido de origem (Caughman et al.[14], 1990; Thonemann et al.[92], 2002). Contudo, recentes investigações têm reportado que o mesmo tipo de célula da cultura primária (por exemplo, fibroblasto) pode responder de forma variada quando frente a um mesmo estímulo (Thonemann et al.[92], 2002; Falconi et al.[28], 2007). Além disto,

determinado número de passagens celulares é requerida para que se estabilize o crescimento celular e, assim, possa ser obtido número desejado de células para a realização do experimento. Segundo Schmalz[75](1994), este procedimento, quando realizado em grande número, pode acarretar mudanças no fenótipo celular, descaracterizando a célula de origem. Ao contrário da cultura de células primárias, o procedimento de cultivo celular com linhagem contínua é mais simples e, portanto, tem uma série de vantagens, tais como: 1 - fácil manipulação; 2 - crescimento homogêneo e padronizado das células; e 3 - tempo prolongado de cultivo (Caughman et al.[14], 1990; Thonemann et al.[92], 2002). Este procedimento favorece a realização de inúmeras passagens sem que haja, contudo, alteração no fenótipo celular. Por este motivo, vários estudos têm preferido a utilização de células permanentes (imortalizadas), as quais apresentam fenótipo semelhante aquele do tecido de origem (Consiglio et al.[19], 1998, Ribeiro et al.[71], 2006). Na presente pesquisa, células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram selecionadas para avaliação dos efeitos citotóxicos transdentinário do cimento ionomérico Vitrebond™. A escolha por este tipo de linhagem celular deve-se ao fato que, em condições clínicas, os odontoblastos são as primeiras células a receberem os efeitos tóxicos dos componentes provenientes de diferentes materiais dentários, via túbulo dentinário (MacDougall et al.[53],1998). Além das células MDPC-23, outras várias linhagens de células odontoblásticas, tais como MO6-G3, RPC2A e RDP4-1 têm sido estabelecidas e imortalizadas em laboratório (Kasugai et al.[44], 1988, Kawase et al.[45], 1990; MacDougall et al.[53], 1998). Este processo de imortalização se resume em inocular um retrovírus

recombinante no interior das células, induzindo-a a expressar fenótipos específicos de odontoblastos. Diferente da MO6-G3, a linhagem MDPC-23 foi imortalizada de forma espontânea, mantendo, assim as características iniciais das células de origem, tais como expressão de colágeno tipo I e proteínas típicas da matriz dentinária, tais como fosforina e sialoproteína da dentina, bem como alta atividade de fosfatase alcalina (Hanks et al.[34],1998).

Muitos estudos têm procurado avaliar a citotoxicidade e o papel de monômeros resinosos liberados de materiais dentários na expressão de proteínas específicas (Engelmann et al.[26], 2002; Issa et al.[41], 2004). Para isto, várias metodologias têm sido empregadas (Bouillaguet et al.[9], 2000; Mantellini et al.[54], 2006). Ribeiro et al.[71], (2006) investigaram o potencial citotóxico tanto do pó quanto do líquido de diferentes cimentos de ionômeros de vidro com o auxílio do corante azul de Trypan. Esta substância interage com a membrana celular fornecendo, além de informações referentes à integridade da membrana, o estado momentâneo da célula, ou seja, se ela se encontra viável ou não. Esta viabilidade celular é determinada mediante a expressão de coloração a qual é fornecida pela identificação das cores amarelas (células vivas) e azul (células mortas) (Ribeiro et al.[71], 2006). Todavia, estudos prévios têm demonstrado que a membrana celular somente sofre alterações em sua arquitetura quando expostas a grandes quantidades de monômeros livres (Issa et al.[41], 2004). Sabe-se que a liberação destes componentes aumenta de forma progressiva a partir do momento inicial da fotoativação até longos períodos após este procedimento (Engelman et al.[27], 2001). Desta forma, inicialmente pequenas quantidades de monômeros são

lançadas no meio aquoso, alcançando assim a superfície da membrana celular. Quando em contato com a superfície da célula, os monômeros interagem com a membrana citoplasmática, ganhando o espaço intracelular para alcançar organelas específicas, como por exemplo, a mitocôndria (Engelman et al.[27], 2001). À medida que o tempo se prolonga, há um aumento na concentração de monômeros na superfície externa da célula, de tal forma que estes componentes passam a se depositar de forma progressiva sobre a bicamada de fosfolipídios, resultando em alteração na arquitetura da membrana e, por conseguinte, lise da celular (Engelman et al.[27], 2001). Dentro deste contexto, o ensaio que utiliza o corante azul de trypan pode revelar resultados de toxicidade quando apenas altas concentrações de monômeros alcançam a superfície celular. Contudo, pode se suspeitar, com base nos achado de Issa et al.[41], (2004), que as células já podem sofrer alterações intracelulares nos momentos iniciais logo após a fotoativação do material, quando a concentração de monômeros ainda é baixa. Dentro deste contexto, o ensaio através do qual a produção de enzimas mitocondriais é avaliada parece ser mais sensível para identificar o grau da toxicidade do material a ser investigado do que através dos métodos os quais investigam apenas a integridade da membrana celular. Por este motivo, e devido ao fato do teste de MTT ser amplamente utilizado na odontologia (Bouillaguet et al.[9], 2000; Issa et al.[41], 2004; Mantellini et al.[54], 2006), é que na presente pesquisa este ensaio foi selecionado para avaliar os efeitos citotóxicos transdentinários de CIVMR

O cimento de ionômero de vidro Vitrebond™ tem apresentado adequados resultados de biocompatibilidade em estudos realizados in vivo quando aplicado

sobre substrato dentinário de cavidades profundas (Costa et al.[21], 2003). Segundo estes autores, o cimento de ionômero de vidro Vitrebond™ não é capaz de desencadear uma resposta inflamatória ou causar desorganização do tecido pulpar, mesmo quando o remanescente dentinário apresenta espessura muito delgada, tal como 272µm. Por outro lado, quando o mesmo material foi avaliado in vitro, em contato direto com células cultivadas, observou-se notável efeito tóxico (Souza Costa et al.[83], 2006). Neste tipo de estudo in vitro, as concentrações dos componentes do material que alcançam as células pulpares em cultura não correlacionam diretamente com àquelas quantidades que chegam à polpa quando o material forrador é aplicado em cavidades profundas em dentes humanos. Isto se deve ao fato que a presença da barreira dentinária, bem como outros fatores inerentes ao tecido pulpar, exerce papel fundamental na proteção de células localizadas tanto na periferia quanto no centro da polpa dental (Galler et al.[29], 2005). Por este motivo, pesquisadores têm procurado conjugar ao estudo do mecanismo de ação tóxica dos componentes liberados de materiais forradores e capeadores parâmetros observados in vivo, tais como pressão pulpar, permeabilidade do substrato e remanescente dentinário (Schmalz et al.[77], 1996; Bouillaguet et al.[8],1998; Hashied et al.[35], 1998; Çetinguç et al.[16], 2007). Neste contexto, o emprego da metodologia da barreira dentinária se torna uma ferramenta útil e segura para se avaliar os fatores que podem vir a ocorrer com células cultivadas, quando materiais forradores são aplicados diretamente sobre a dentina com ou sem presença de smear layer. Por este motivo, o emprego de discos de dentina com espessura inferior a 0,5 mm ocorreu no presente estudo,

caracterizando assim uma cavidade muito profunda, a qual representa um desafio importante para o clínico. Além do fator profundidade da cavidade, a presença da smear layer também tem sido investigada quanto ao potencial de comprometer a interação do material forrador com o substrato dentinário (Tay et al.[88,89], 2000; Tay et al.[90], 2001). Tem sido relatado que a presença de smear layer é capaz de interferir na interação de materiais a base de resina com o tecido dentinário (Eick et al.[25], 1992). Características pertinentes à smear layer, tais como rugosidade e espessura podem impedir a penetração em profundidade de materiais que não requerem um condicionamento prévio do substrato anteriormente à sua aplicação. A baixa capacidade de determinados materiais em condicionar dentina localizada logo abaixo se deve ao fato de que os debris depositados sobre este tecido tubular são capazes de exercer forte efeito tamponante sobre os ácidos incorporados na composição dos materiais a base de resina (Tay et al.[88,89], 2000). Além disto, o arcabouço de restos de dentina, esmalte, brocas, fibrilas de colágeno e prolongamentos de odontoblastos protegem bactérias, que durante seu metabolismo, eliminam produtos nocivos, os quais podem se difundir através dos túbulos dentinários para causar reações inflamatórias pulpares irreversíveis. Por este motivo, na presente pesquisa, a remoção de smear layer de diferentes espessuras, através da aplicação de EDTA a 0,5M por 30s, foi investigada previamente à aplicação do cimento de ionômero de vidro modificado por resina, Vitrebond™, o que caracterizou os grupos experimentais G4*M* e G5*M*. Para os grupos G2*M* e G3*M*, a smear layer tanto espessa quanto delgada, respectivamente, foram mantidas sobre a superfície oclusal dos discos de dentina, tal como

recomendado pelo fabricante. Após 24 horas de incubação a 37ºC com 5% de CO_2, as células aderidas à superfície pulpar dos discos de dentina apresentaram os seguintes valores percentuais de redução do metabolismo: 54,85%; 60,79%; 64,12% e 62,51% para os grupos G2*M*, G3*M*, G4*M* e G5*M*, respectivamente. Segundo o teste estatístico de Mann-Whitney, diferenças significativas não foram identificadas entre os grupos experimentais. A ausência de diferença estatística entre os grupos experimentais pode ter ocorrido devido à possível permanência de estruturas no interior dos túbulos dentinários. Embora a smear layer tenha sido removida da superfície da dentina através da aplicação de EDTA nos grupos G4*M* e G5*M*, o smear plug permaneceu presente, o que pode ter ocluído o lúmen dos túbulos dentinários parcial ou totalmente (Figura 9). Assim, pode-se sugerir que uma maior difusão de substâncias tóxicas e componentes do Vitrebond™ pode ter sido prevenida pela presença de restos de debris no interior dos túbulos dentinários. Além disto, a presença de produtos da reação entre o smear plug e dentina com o ácido polialquenóico, presente no líquido do Vitrebond™, pode ter contribuído, também, para uma maior proteção das células odontoblastóides (Figura. A1). Estruturas similares a cristais, tal como aquelas observadas na Figura A1 , também foram previamente demonstradas por Titley et al.[93], (1996). Tem sido relatado que os cristais presentes sobre a superfície dentinária seriam responsáveis por diminuir, de forma significativa, a permeabilidade da dentina (Pereira et al.[65], 2005). Neste contexto, para o presente estudo, a presença de produtos de reação resultantes da interação do líquido do Vitrebond™ com restos de smear layer e smear plugs pode ser, pelo menos em parte, responsável pela não

diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais com ou sem aplicação de EDTA sobre a dentina.

Muitos estudos têm atribuídos o efeito tóxico dos cimentos de ionômero de vidro modificado por resina aos componentes orgânicos presentes em sua matriz, tal como o HEMA, o qual tem sido identificado em extratos aquosos de cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Geurtsen et al.[30,31], 1998; Stanilawski et al.[85], 1999; Shoeili et al.[82], 2003, Rogalewicz et al.[72], 2006). Algumas investigações demonstraram que devido ao baixo peso molecular do HEMA (PM=130,1), este monômero hidrófilo é capaz de se difundir em grande quantidade e em curto período de tempo, através dos túbulos dentinários, em direção ao tecido pulpar (Bouillaguet et al.[8], 1998; Çetingüç et al.[16], 2007). Estudo recente demonstrou que um sistema adesivo autocondicionante de 2 passos foi capaz de liberar 0,5µg de HEMA quando aplicado sobre dentina com remanescente dentinário de espessura igual a 0,5mm (Rathke et al.[68], 2007). Os sistemas adesivos contemporâneos possuem, em média, a quantidade de 30-50% de HEMA em sua composição o que corresponde a 4000mmol/l na máxima concentração. O HEMA tem mostrado ter um fator de diluição de 1000 ou 5000 vezes através da dentina que apresenta espessura de 0,5mm com pressão de 10cm de H_2O, respectivamente (Bouillaguet et al,[9]. 1998). Na presente pesquisa, o material Vitrebond™, o qual possui o mesmo princípio de aplicação dos sistemas adesivos autocondicionantes, foi aplicado sobre discos de dentina com 0,4mm de espessura. Desde que uma solução de 50% de HEMA puro equivale a 4000mmol/l, pode se especular que para o Vitrbeond™ (20-25% de HEMA), uma

quantidade do monômero hidrofílico HEMA de aproximadamente 1600-2000mmol/l seria capaz de alcançar o lado pulpar. Quando observado o fator de diluição da dentina, poderia se especular que a quantidade de monômero HEMA capaz de alcançar as células odontoblastóides, no presente estudo, estaria na ordem de aproximadamente 1,6-2,0mmol/l para o menor fator de diluição. Segundo recente investigação, esta quantidade de HEMA (1-3mmol/) em contato com células por um período prolongado seria capaz de diminuir a expressão da proteína procolágeno α1 tipo 1, a qual desempenha papel fundamental no processo de cura do tecido pulpar, durante a síntese de matriz dentinária (Zago et al.[100], 2007). Por outro lado, outro estudo demonstrou que uma quantidade 3 vezes maior que aquela calculada na presente pesquisa (1600-2000mmol/l) do monômero hidrofílico HEMA seria necessária para alcançar o lado pulpar dos discos de dentina e causar alterações no DNA celular e, por conseguinte paralisação no ciclo celular dentro de um período de 24 horas de incubação (Scweikl et al.[78], 2007). Particularmente para o grupo G2*M* e G3*M*, essa concentração pode ser ainda menor se for levado em consideração que o material experimental utilizado no presente estudo é aplicado sobre dentina coberta com smear layer, a qual é responsável por reduzir, de forma significativa, a permeabilidade dentinária. Contudo, na presente pesquisa, as imagens obtidas com microscopia eletrônica de varredura para todos os grupos experimentais demonstraram uma grande quantidade de espaços com ausência de células, possivelmente deslocadas do substrato dentinário por se apresentarem mortas. Assim, pode-se especular que além do monômero hidrofílico HEMA, outros

componentes encontrados na composição do Vitrebond™ podem ter se difundido através dos túbulos dentinários para alcançar o espaço pulpar. Tem sido relatado que o monômero HEMA pode ser capaz de funcionar como carreador de outras substâncias, as quais podem aumentar o efeito tóxico do material (Schmalz et al.[76], 2002). Segundo Guertsen et al.[31] (1998), o Vitrebond™, diferentes de outros materiais a base de resina, possuem na sua composição um fotoiniciador alternativo à canforoquinona, denominado de cloreto de difenil iodônio. Este composto parece sofrer decomposição de sua forma original, resultando em três componentes: cloreto de benzeno, iodeto de benzeno e brometo de benzeno, os quais apresentam os seguintes pesos moleculares: 107,5; 199 e 152, respectivamente. Estes componentes, de baixo peso molecular e elevado efeito citotóxico, também seriam capazes de se difundirem através dos túbulos dentinários e alcançar as células pulpares. Todavia, estudos futuros poderiam ser realizados com o intuito de poder verificar a capacidade de difusão destas substâncias através da dentina tubular.

Além dos efeitos citotóxicos do CIVMR Vitrebond™, a propriedade mecânica de resistência de união também foi avaliada quando o material experimental foi aplicado sobre dentina coberta com smear layer de diferentes espessuras ou quando esta estrutura foi removida. Na presente pesquisa, para criação de duas smear layer com espessuras diferentes, lixas abrasivas de granulação 180 e 600 foram empregadas. Segundo estudo de Koibuchi et al.[49], (2001), a dentina coberta com smear layer produzida por papéis abrasivos de granulação 600 apresenta uma resistência adesiva sobre estimada, quando

comparada com aquela obtida sobre dentina coberta com smear layer produzida clinicamente. Todavia, este tipo de procedimento tem sido empregado em diversos trabalhos que avaliam a influência da smear layer sobre a adesão de materiais resinosos aplicados diretamente sobre o substrato dentinário (Tay et al.[88,89], 2000; Ogata et al.[60], 2001; Reis et al.[70], 2005). A smear layer criada a partir do contato da dentina com lixas abrasivas de granulação 600 apresenta a característica de ser uniforme, compacta e com espessura de aproximadamente 0,5 µm. Por outro lado, diferente da lixa abrasiva de granulação 600, tem sido demonstrado que o emprego da lixa de granulação 180 proporciona a formação de smear layer com características semelhantes àquela observada clinicamente sobre dentina tratada com brocas carbide (Tay et al.[88,89], 2000). Neste caso, a smear layer apresenta-se mais rugosa e menos consistente, alcançando espessuras que podem variar de 0,7-3,3µm. Neste contexto, era de se esperar que diferenças fossem observadas entre a resistência de união do material experimental com o substrato dentinário. Segundo o teste estatístico ANOVA, diferenças estatísticas não foram identificadas entre os dois grupos experimentais G3*R* e G4*R*. Quando aplicado sobre substrato dentinário tratado com lixas de granulação 600 (G4*R)* e 180 (G3*R*), o material experimental Vitrebond™ apresentou os valores de resistência de união de 7,5MPa e 7,4MPa, respectivamente. Tem sido demonstrado que adesivos autocondicionantes de pH moderado (pH=2,7) são capazes de modificar a smear layer de diferentes espessuras sem necessitar da remoção prévia desta estrutura amorfa, e formar uma camada híbrida fina com dimensões em torno de 400 a 500nm (Tay et al.[88,89], 2000; Chan et al.[17], 2003).

No caso do CIVMR Vitrebond™, o líquido que o compõe possui em sua formulação o ácido poliacrílico, o qual é considerado um ácido fraco, apresentando pH em torno de 2,5. Quando empregado de forma isolada, o ácido poliacrílico é capaz de remover a smear layer criada com lixa de granulação 600 e reagir com o substrato dentinário localizado logo abaixo (Titley et al.[93], 1996). Em contrapartida, quando a mistura do pó com o líquido do Vitrebond™ é realizada, o pH apresentado pelo material alcança um valor superior àquele apresentado somente pelo ácido (pH=3,6) (Ben-Amar[5], 1999). Quando comparado com os sistemas adesivos autocondicionantes de pH moderado, os quais variam de 2,0-2,7, o valor de pH apresentado pelo Vitrebond™ parece ser ineficaz em modificar a smear layer de ambas espessuras e desmineralizar a dentina localizada logo abaixo. Este fato pode sugerir a não diferença significativa encontrada pelo teste de ANOVA para ambos os grupos experimentais onde o material foi aplicado sobre a smear layer delgada e espessa.

Na tentativa de melhorar a resistência de união do CIVMR com o substrato dentinário, tem sido sugerido o tratamento prévio da dentina com diferentes substâncias condicionadoras (Tay et al.[90], 2001; Tanumiharja et al.[87], 2001). Prati et al.[67], (1992) investigaram o efeito de diversos tipos de tratamento sobre a dentina previamente à aplicação de Vitrebond™. Os melhores resultados foram obtidos com a solução de oxalato de potássio e EDTA. Na presente pesquisa, smear layer de diferentes espessuras foi removida pela aplicação prévia de EDTA a 0,5M pelo tempo de 30s. Para os grupos G1*R* e G2*R*, os valores de resistência de união foram de 6,4MPa e 6,7MPa para a dentina condicionada com EDTA

aplicado sobre smear layer espessa e delgada, respectivamente. Quando comparados com os grupos G3*R* e G4*R*, através da análise de variância (ANOVA), não foi identificada qualquer diferença significativa entre os quatro grupos experimentais. Recente investigação demonstrou que a aplicação de EDTA a 0,5 M pelo tempo de 30s é capaz de remover completamente smear layer do substrato dentinário (Jacques, Hebling[43], 2005), deixando esta estrutura disponível para adesão. Todavia, estudo recente demonstrou que a solução de EDTA a 0,5M é responsável também por diminuir a energia livre de superfície da dentina, interferindo na capacidade de molhamento deste substrato, e, portanto, prejudicando o mecanismo de adesão (Buzoglu et al.[11], 2007). Desta forma, era de se esperar que este fator viesse a determinar uma redução significativa na resistência de união para ambos os grupos experimentais onde a smear layer de diferentes espessuras foi removida. Entretanto, a redução nos valores de resistência de união observada na presente pesquisa não ocorreu de forma significativa quando o substrato dentinário recebeu aplicação prévia de EDTA. Pode-se suspeitar que determinados mecanismos possam estar atuando de forma efetiva na interação da dentina com o CIVMR Vitrebond™.

O CIVMR, utilizado na presente pesquisa, consiste de partículas de vidro degradáveis na presença de ácido, soluções de poliácidos e ingredientes monoméricos tal como o HEMA. Durante a reação de presa do cimento, imediatamente após a mistura do pó com o líquido, uma reação do tipo ácido-base é iniciada. Além disto, na presença de luz visível uma reação de polimerização intermediada pelos radicais livres monoméricas vem a ocorrer, formando uma

rede tridimensional de ligações cruzadas covalentes. Ao final da mistura, o CIVMR consiste de sais, polyHEMA e sais poliacrilatos (Yelamanchili et al.[99], 2008). Durante o processo de maturação da maioria dos CIVMRs, a presença de sais localizados na interface entre material e dentina exerce forte influência na atração de moléculas de água em virtude da diferença de osmolaridade entre ambos os corpos. Como a dentina esta desprovida de smear layer, um aumento significativo na permeabilidade pode ocorrer. Neste sentido, a água proveniente da dentina interage com moléculas de HEMA, encontradas na composição dos CIVMRs, formando um hidrogel de poli(HEMA). O HEMA melhora as propriedades físicas dos CIVMR bem como a resistência de união deste material com a dentina (Rusz et al.[73], 1992). Esta camada de hidrogel e poli(HEMA) tem sido relatado por Sidhu et al.[81], (2002) e Sidhu; Watson[79], (1998) como camada de "absorção", a qual é formada pela absorção de água proveniente da dentina durante o processo de maturação do CIVMR. Recente investigação demonstrou que esta camada de absorção é responsável pela adequada resistência de união de determinados CIVMRs (Sidhu et al.[80], 1999). Todavia, tem sido relatado que esta camada somente é formada em regiões de alta permeabilidade, tal como sobre os cornos pulpares. Este tipo de camada de "absorção" não tem sido descrito na dentina superficial nem na interface do esmalte com CIVMR. Assim pode-se especular que este tipo de camada pode ter contribuído, pelo menos em parte, para a não diferença estatística observada entre os grupos experimentais.

Além disto, outro fator pode ter contribuído para que não houvesse diferenças significativas entre os grupos experimentais, onde a smear layer

permaneceu presente, daqueles grupos onde esta estrutura amorfa foi removida. Batista et al.[4], (2007) observaram que a dentina tratada com EDTA apresenta-se como uma superfície muito mais rugosa do que aquela onde a smear layer permanece aderida. Além da própria ação do EDTA, o procedimento de desgaste do substrato dentinário com lixas d'água de diferentes granulações é responsável por determinar estriações sobre a dentina. Na presente pesquisa, os espécimes tratados com lixa de granulação 180 e 600 apresentaram estriações, quando observados em MEV (Figura A2), referentes ao procedimento de desgaste do substrato dentinário mesmo após a remoção de smear layer. Assim, pode-se especular que na ausência de smear layer, este dois fatores: (1) formação de uma possível camada de "absorção" entre material experimental e dentina; e 2) presença de estriações decorrentes do desgaste do substrato, podem ser responsáveis pela ausência de diferença significativa observada entres os quatro grupos experimentais, quando a resistência de união foi avaliada.

Embora os resultados da presente pesquisa tenham demonstrado que o CIVMR Vitebond™ apresenta notável efeito tóxico sobre células cultivadas na presença ou ausência de smear layer de diferentes espessuras e que a adesão do material forrador experimental pode não ser comprometida pela aplicação de solução com EDTA a 17%, trabalhos futuros deverão investigar a ação de diferentes substâncias que apresentam a capacidade de melhorar a força de união entre dentina e material forrador. Porém, este agente deverá também apresentar propriedades antibacterianas adequadas, além de ser capaz de induzir células do

complexo dentino-pulpar ao processo de reparo ou de não interferir na síntese de matriz dentinária reacional.

7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada, pode-se concluir que:

- A aplicação de CIVMR Vitrebond™ sobre discos de dentina com espessura de 0,4mm resultou em diminuição do metabolismo celular bem como na redução da população de células MDPC-23 cultivadas no lado pulpar (MEV), independente da presença ou ausência de smear layer de diferentes espessuras;

- A presença de smear layer de diferentes espessuras (espessa e delgada) bem como a sua remoção através da aplicação com solução de EDTA a 0,5M pelo tempo de 30s, não interferiu de forma significativa nos valores de resistência de união.

8 Referências*

1. Abou Hashieh I, Franquin JC, Cosset A, Dejou J, Camps J. Relationship between dentine hydraulic conductance and the cytotoxicity of four dentine bonding resins in vitro. J Dent. 1998; 26: 473-7.
2. Ayad MF, Rosenstiel SF, Hassan MM. Surface roughness of dentin after tooth preparation with different rotatory instrumentation. J Prosthet Dent. 1996; 75: 122-8.
3. Banditmahakun S, Kuphausuk W, Kanchanavasita W, Kuphasuk C. The effect of base materials with different elastic modulo on the fracture loads of machinable ceramic inlays. Oper Dent. 2006; 31: 180-7.
4. Batista LHC, Silva Jr JG, Silva MF, Tonholo J. Atomic force microscopy of removal of dentin smear layer. Micros Microanal. 2007; 13: 245-50.
5. Ben-Amar A, Liberman R, Apatowsky U, Pilo R. pH changes of glass-ionomer lining materials at various time intervals. J Oral Rehabil. 1999; 26: 847-52.
6. Blomlöf J, Blomlöf L, Lindskog S. Effect of different concentrations of EDTA on smear layer removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. J Clin Periodontol. 1997; 24:534-7.
7. Blomlöf JP, Blomlöf LB, Cederlund AL, Hultenby KR, Lindskog SF. A new concept for etching in restorative dentistry. Int J Periodontics Restorative Dent. 1999; 19: 30-5.

* De acordo com estilo Vancouver. Disponível no site:http:/www.nlm.nih.gov/bsduniform_requeriments.html

8. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. J Oral Rehabil. 1998; 25: 45–51.

9. Bouillaguet S, Wataha JC, Virgillito M, Gonzalez L, Rakich DR, Meyer J-M. Effect of sub-lethal concentrations of HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate) on THP1- Human monocyte-macrophages, in vitro. Dent Mater. 2000; 16: 213-7.

10. Brannström M, Nordenvall KJ, Glantz PO. The effect of EDTA containing surface active solutions on the morphology of prepared dentin: an in vivo study. J Dent Res. 1980; 59: 127-31

11. Buzoglu HD, Calt, S, Gumusderelioglu M. Evaluation of the surface free energy on root canal dentine walls treated with chelating agents and NaOCL. Int J Endod. 2007; 40: 18-24.

12. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. J Endod. 2002; 28: 17-9.

13. Cattani-Lorente MA, Dupuis V, Payan J, Moya F, Meyer JM. Effect of water on the physical properties of resin-modified glass ionomer cements. Dent Mater. 1999; 15: 71-8.

14. Caughman W, Caughman GB, Wilburn T, Dminy BS, Schuster GS. Glass ionomer and composite resin cements: effect on oral cells. J Prosthet Dent. 1990; 63: 513-7.

15. Cederlund A, Jonsson B, Blomlöf J. Shear strength after ethylenediaminetetraacetic acid conditioning of dentin. Acta Odontol Scand. 2001; 59: 418-22.

16. Çetingüç A, Ölmez S, Vural N. Hema diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. Dent Mater. 2007; 23: 302-7.

17. Chan KM, Tay FR, King NM, Imazato S, Pashley DH. Bonding of mild self-etching primers/adhesives to dentin with thick smear layers. Am J Dent. 2003;16:340-6.

18. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. Biomaterials. 2005; 26: 745-53.

19. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo G, et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. Arch Oral Biol. 1998; 43: 65-71.

20. Costa CA, Hanks TC. Dental restorative material biocompatibility. Braz Endod J. 1998; 3: 7-13.

21. Costa CAS, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to resins-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. Dent Mater. 2003; 19: 739-46.

22. Coutinho E, Yoshida Y, Inoue S, Fukuda R, Snauwaer J, Kakayama Y et al. Gel phase formation at resin-modified glass-ionomer/tooth interfaces. J Den Res. 2007; 86: 656-61.

23. Demirci M, Hiller K-A, Bols C, Galler K, Schmalz G, Schweikl. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesive. Dent Mater. 2008; 24: 362-71.

24. Dippel HW, Borggreven JM, Hoppenbrouwers PM. Morphology and permeability of the dentinal smear layer. J Prosthet Dent. 1984; 52: 657-62.

25. Eick J B, Robinson, S J, Cobb C M. The dentinal surface. Its influence on dentinal adhesion. Part II. Quintessence Int. 1992: 23; 43-51.

26. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effetc of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. J Biomed Mater Res. 2002; 63: 746-51.

27. Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Metabolic effects of dental resin components in vtro detected by NMR spectroscopy. J Dent Res. 2001; 80: 869-75.

28. Falconi M, Teti G, Zago M, Pelotti S, Breschi L, Mazzotti G. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. Cell Biol Toxicol. 2007; 23: 313-22

29. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. J Endod. 2005; 31: 396-9.

30. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. Eur J Oral Science. 1998; 106: 687-95.

31. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer additive and release variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. J Dent Res. 1998; 77: 2012-9.

32. Glasspolle EA, Erickson RL, Davidson CL. Effect of surface treatments on the strength of glass ionomers to enamel. Dent Mater. 2002; 18: 454-62.

33. Gordan VV, Boyer D, Söderholm KJ. Enamel and dentine shear bond strength of two resin modified glass ionomer and two resin based adhesive. J Dent. 1998; 26: 497-503.

34. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. Connect Tissue Res. 1998; 37: 233-49.

35. Hashied IA, Franquim JC, Dejou J, Camps J. Relationship between dentin hydraulic conductance and the cytotoxicity of four dentin bonding resins in vitro. J Dent. 1998; 26: 473-7.

36. Hinoura KO, Moore BK, Philips RW. Influence of dentine surface treatments on the bond strength of dentin lining cements. Oper Dent. 1986; 11: 147-54.

37. Hitmi L, Bouter D, Degrange. Influence of drying and HEMA treatment on dentin wettability. Dent Mater. 2002, 18: 503-11.

38. Hotz P, McLean JW, Sced I, Wilson AD. The bonding of glass ionomer cement to metal and tooth substrate. Br Dent J. 1977; 142: 41-7.

39. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94: 361-5.

40. Inoue S, van Meerbeek B, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G et al. Effect of remaining dentins thickness and use of conditioner on microtensile bond strength of glass-ionomer adhesive. Dent Mater. 2001; 17: 445-55.

41. Issa Y, Watts DC, Brunton PA, Waters CM, Duxbury AJ. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. Dent Mater. 2004; 20: 12-20.

42. Itou K, Torii Y, Suzuki K, Makai H, Inoue K. Adhesion of restorative resin to tooth – Adhesion promoted by Liner Bond II. J Adhes Dent. 1994; 12: 174-81.

43. Jacques P, Hebling J. Effect of dentin conditioners on the microtensile bond strength of a conventional and self-etching primer adhesive system. Dent Mater. 2005; 21: 103-9.

44. Kasugai S, Adachi M, Ogura H. Establishment and characterization of clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor. Arch Oral Biol. 1988; 33: 887-91.

45. Kawase T, Orikasa M, Suzuki A. A clonal prostaglandin-responsive cell line (RDP4-1) derived from rat dental pulp. Bone Miner. 1990; 11: 163-75.

46. Kelly JR. Perspectives on strength. Dent Mater. 1995; 11: 103-10.

47. Kenshima S, Francci CE, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE. Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. J Dent. 2006; 34: 775-83.

48. Kent BE, Wilson AD. The properties of glass-ionomer cement. Br Dent J. 1973; 135: 322-6.

49. Koibuchi H, Yasuda N, Nakabayshi N. Bonding to dentin with self-etching primer: the effect of smear layers. Dent Mater. 2001; 17: 122-6.

50. Lee D, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yahg HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptois caused by dental resin monomers in cell culture. Dent Mater. 2006; 22: 1086-92.

51. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsch M, Sapotnick, Geurtsen W. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. Biomaterials. 1998; 19: 559-64.

52. Lin A, McIntyre NS, Davidson RD. Studies on the adhesion of glass ionomer cements to dentin. J Dent Res. 1992; 71: 1836-41.

53. MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Carnes DL. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. Am J Dent. 1998; 11: 11-6.

54. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. J Dent Res. 2003; 82: 592-6.

55. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. Quintessence Int. 1994; 25: 587-9.

56. Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Souza Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontblast cell line MDPC-23. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 104:e102-8.

57. Mitra SB. Adhesion to dentine and physical properties of light-cured glass ionomer liner/base. J Dent Res. 1991; 70: 72-4.

58. Nicholson JW. Chemistry of glass-ionomer cements: review. Biomaterials. 1998; 19: 485-94.

59. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. Dent Mater. 2008; 24: 1702-8.

60. Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, Nakajima M, Pereira PN, Tagami J. Effects of different burs on dentin bond strengths of self-etching primer bonding systems. Oper Dent. 2001; 26: 375-82.

61. Oliveira SSA, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall Jr GW. The influence of dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. total-etch system. Dent Mater. 2000; 19: 758-67.

62. Osório R, Erhardt MCG, Pimenta LAF, Osorio E, Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds resistance to degradation. J Dent Res. 2005; 84: 736-40.

63. Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetyl cysteine protects Dental Pulp Stromal Cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. Free Radicl Biol Med. 2007; 43: 1394-408.

64. Pashley DH, O'Meara JA, Kepler EE, Galloway SE, Thompson SM, Stewart FP. Dentin permeability: Effects of desensitizing dentifrices in vitro. J Periodontol. 1984; 55: 522-5.

65. Pereira JC, Segala AD, Gillam DG. Effect of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin subjected to different surface pre-treatments – an in vitro study. Dent Mater. 2005; 21: 129-38.

66. Pereira PNR, Sano H, Ogata M, Zheng L, Nakajima M, Tagami J, et al. Effect of region and perfusion on Bond strengths of resin-modified glass ionomer cements. J Dent. 2000; 28: 347-54.

67. Prati C, Montanari G, Biagini G, Fava F, Pashley DH. Effects of dentin surface treatments on the shear bond strength of Vitrabond. Dent Mater. 1992; 8: 21-6.

68. Rathke A, Gambin, Haller B. Dentin diffusion f HEMA released from etch-and-rinse and self-etch bonding systems. Eur J Oral Sci. 2007; 115: 510-6.

69. Reichl FX, Esters M, Simon S, Seiss M, Kehe K, Kleinasser N, et al. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. Arch Toxicol. 2006; 80: 370-7.

70. Reis A, Grandi V, Carlotto l, Bortoli G, Patzalaff R, Accorine MLR, et al. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. J Dent. 2005; 33: 549-59.

71. Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. J Mater Sci Mater Med. 2006; 17: 495-500.

72. Rogalewiscz R, Batko K, Voelkel A. Identification of organic extractables from commercial resin-modified glass-ionomer using HPLC-MS. J Environ Monit. 2006; 8: 750-8.

73. Rusz JE, Antonucci JM, Eichmiller F, Anderson MH. Adhesive properties of modified glass-ionomer cements. Dent Mater. 1992; 8: 31-6.

74. Schmalz G, Garhammer P, Schweiki H. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. J Endod. 1996; 22: 249-52.

75. Schmalz G, Schweikl H, Eibl M. Growth kinetics of fibroblasts on bovine dentin. J Endod. 1994; 20: 453-6.

76. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweiki H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. J Endod. 2002; 28: 188-92.

77. Schmalz G, Schweikl H, Esch J, Hiller KA. Evaluation of a dentin barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. J Endod. 1996; 22: 112-5.

78. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by n-acetylcysteine. Dent Mater. 2007; 23: 688-95.

79. Sidhu SK, Watson TF. Interfacial characteristics of resin modified glass-monomer materials: a study on fluid permeability using confocal fluorescence microscopy. J Dent Res. 1998; 77:1749-59.

80. Sidhu SK, Sherriff M, Watson TF. Failure of resin-modified glass-ionomers subjected to shear loading. J Dent. 1999; 27: 373–81.

81. Sidhu SK, Pilecki P, Cheng PC, Watson TF. The morphology and stability of resin-modified glass-ionomer adhesive at the dentin/resin-based composite interface. Am J Dent. 2002; 15: 129—36.

82. Soheili Majd E; Goldberg M; Stanislawski L. In vitro effects of ascorbato e Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. Biomaterials**.** 2003; 24: 3-9.

83. Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. Biomaterials. 2003**;** 24: 3853-8.

84. Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007; 81: 175-84.

85. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. J Biomed Mater Res (Appl Biomater). 1999; 48: 277-88.

86. Tani C, Finger WJ. Effect of smear layer thickness on bond strength mediated by three all-in-one self-etching priming adhesive. J Adhes Dent. 2002; 4: 283-9.

87. Tanumiharja M, Burrow MF, Cimmino A, Tyas MJ. The evaluation of four conditioners fro glass ionomer cements using field-emission scanning electron microscopy. J Dent. 2001; 29:131-8.

88. Tay FR, Carvalho R, Sano H, Pashley DH. Effect of smear layer on the bonding of a self-etching primer to dentin. J Adhes Dent. 2000; 2: 99-116.

89. Tay FR, Sano H, Carvalho R, Pashley EL, Pashley DH. An ultrastrucutural study of the influence of acidity of self-etching primers and smear layer thickness on bonding to intact dentin. J Adhes Dent. 2000; 2: 83-98.

90. Tay FR, Smales RJ, Ngo H, Wei SHY, Pashley DH. Effect of different conditioning protocols on adhesion of a GIC to dentin. J Adhes Dent. 2001; 3: 153-67.

91. Tay FR, Sidhu SK, Watson TF, Pashley DH. Water-dependent interfacial transition zone in resin-modified glass-ionomer cement/dentin interfaces. J Dent Res. 2004; 83:644-9.

92. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl. Response of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. Dent Mater. 2002; 18:318-23.

93. Titley KC, Smith DC, Chernecky. SEM observations of the reactions of the components of a light-activated glass polyalkenoate (ionomer) cement on bovine. J Dent. 1996; 24: 411-6.

94. Titley KC, Chernecky R, Marie B, Valiquette N, Smith DC. The morphology of the demineralized layer in primed dentin. Am J Dent. 1994; 7: 22-6.

95. Wahle JJ, Wendt SL. Dentinal surface roughness: a comparison of tooth preparation techniques. J Prosthet Dent. 1993; 69: 160-4.

96. Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by phenyl-p self-etching primer. J Dent Res. 1994; 73: 1212-20.

97. Wilson AD. Resin-modified glass ionomer cements. Int J Prosthodont. 1990; 3: 425-9.

98. Yap AUJ, Tan ACS, Goh ATS, Goh DCG, Chin KCT. Effect of surface treatment and cement maturation on the bond strength of resin-modified glass ionomers to dentin. Oper Dent. 2003; 28: 728-33.

99. Yelamanchili A, Darvell BW. Network competition in a resin-modified glass-ionomer cement. Dent Mater. 2008; 24: 1065–9.

100. Zago M, Teti G, Mazzotti G, Ruggeri A, Breschi L, Pelotti S, et al. Expression of procollagen α1 type1 and tenascin proteins induced by HEMA in human pulp fibroblasts. Toxicol In Vitro. 2008; 22:1153-9.

9 ANEXOS

9.1 Certificado do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA " JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado *"INFLUÊNCIA DA PRESENÇA OU NÃO DE SMEAR LAYER DE DIFERENTES ESPESSURAS SOBRE A ADESÃO E CITOTOXICIDADE DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO POR RESINA"*, sob o protocolo nº 15/07, de responsabilidade do Pesquisador (a) *CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA*, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled *"INFLUENCE WITH AND NO WITH THIN AND THICK SMEAR LAYER ON ADHESION AND CITOTOXICITY OF RESIN MODIFIED GLASS IONOMER"*, protocol number 15/07, under Dr *CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA*, responsability, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee. FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur.

Araraquara, 02 de agosto de 2007.

Profª Drª *Marian Aparecida Onofre*
Coordenadora

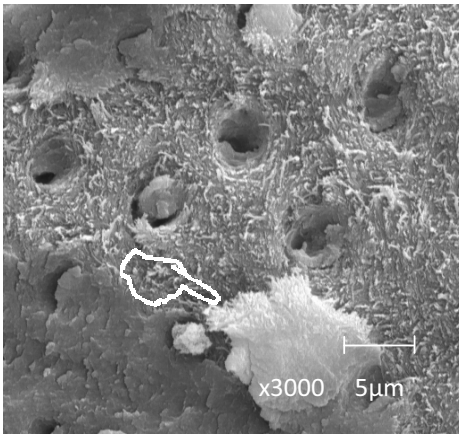


Figura A1 - Fotomicrografia representativa dos grupos G4 e G5. Pode-se observar fibrilas de colágeno expostas e estrutura de possível reação do substrato com material experimental (indicador). MEV (Aumento original x3000)

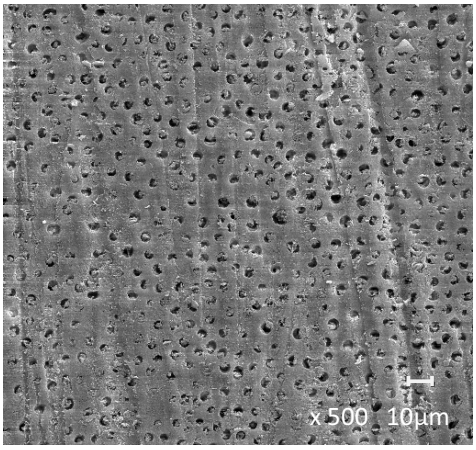


Figura A2 - Fotomicrografia representativa da ação do EDTA a 05M sobre o substrato dentinário. Observe a grande quantidade de estriações decorrente do procedimento de desgaste com lixa d'àgua de granulação 180. MEV (Aumento original de x500).

Valores de Permeabilidade dos discos de dentina com 0,4mm de espessura

	Grupos				
Discos	G1	G2	G3	G4	G5
1	0.0012	0.0012	0.0014	0.0012	0.0012
2	0.0036	0.0036	0.0036	0.0036	0.0036
3	0.0016	0.0016	0.002	0.0018	0.0017
4	0.0056	0.0056	0.0048	0.0048	0.0052
5	0.0022	0.0022	0.0023	0.0023	0.0021
6	0.0026	0.002	0.0028	0.002	0.0034
7	0.0008	0.0008	0.001	0.001	0.001
8	0.006	0.0064	0,0044	0.0072	0.0072

Valores e Médias dos grupos controle e experimentais obtidos a partir do teste de MTT.

	CONTROLE (G1)	SLE (G2)	SLD (G3)	SLE Removida (G4)	SLD Removida (G5)
1	**0,2054**	**0,1032**	**0,0696**	**0,0627**	**0,0536**
2	**0,1782**	**0,0672**	**0,0598**	**0,0516**	**0,0655**
3	**0,1829**	**0,0772**	**0,0708**	**0,0674**	**0,0652**
4	**0,1381**	**0,0690**	**0,0757**	**0,0661**	**0,0663**
5	**0,1678**	**0,1116**	**0,0816**	**0,0665**	**0,0677**
6	**0,1734**	**0,0602**	**0,0666**	**0,0740**	**0,0875**
Média G1	**0,1743**	**0,0814**	**0,0707**	**0,0647**	**0,0676**

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de março de 2009.

ADRIANO AUGUSTO MELO DE MENDONÇA