

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Campus de Araraquara

PEDRO PAULO CHAVES DE SOUZA

Utilização de células de linhagem odontoblástica
(MDPC-23) em estudos de citotoxicidade e na
avaliação do efeito de fatores de crescimento sobre a
expressão de genes específicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Odontológicas, Área de concentração em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

Araraquara – SP

Souza, Pedro Paulo Chaves de

Utilização de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) em estudos de citotoxicidade e na avaliação do efeito de fatores de crescimento sobre a expressão de genes específicos / Pedro Paulo Chaves de Souza. – Araraquara : [s.n.], 2005.

119f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Odontoblastos 2. Cultura de células 3. Materiais biocompatíveis 4. Dentinogênese I. Título

2005

Pedro Paulo Chaves de Souza

Utilização de células de linhagem odontoblástica
(MDPC-23) em estudos de citotoxicidade e na
avaliação do efeito de fatores de crescimento sobre a
expressão de genes específicos

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre

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

2° Examinador: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado

3° Examinador: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara, 24 de fevereiro de 2005

DADOS CURRICULARES

Pedro Paulo Chaves de Souza

Nascimento 01/09/1980, Belo Horizonte – Minas Gerais

Filiação Emanuel de Souza
Maria Pinheiro Chaves de Souza

1999/2002 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2003-2005: Curso de pós-graduação em Ciências Odontológicas,
Área de Concentração em Odontopediatria, nível
Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara
– UNESP

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Emanuel de Souza. Pela sua dedicação à família e por ter me apoiado todos estes anos. Se cheguei a este dia foi por ter assimilado seus ensinamentos e suas virtudes.

À minha mãe, Maria Pinheiro Chaves de Souza, que mesmo ficando triste por eu ter saído de casa, me deu sempre todo o apoio para que eu buscasse meu caminho. Apesar de estar distante dos olhos, sempre esteve próxima nos sentimentos.

Aos meus irmãos Daquina, Bige, Emanuel, João e Mariana. Cada um de vocês, com personalidades tão distintas, contribuiu de uma forma no meu crescimento pessoal. Amo muito todos vocês.

Ao POVO BRASILEIRO, que mantém, através do pagamento de impostos, o funcionamento da Universidade pública. Espero que com o meu trabalho eu possa estar retribuindo de alguma forma.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Senhor Deus Pai, pelas oportunidades e pelas pessoas que colocou em meu caminho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto, meu COMPADRE, pelos conselhos e pelo incentivo que se iniciaram na minha graduação e perduraram até hoje. Simplesmente o admiro como um irmão mais novo. Meu amigo de infância, pena que só nos conhecemos depois...

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, meu orientador na iniciação científica, ao Grupo de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, e aos técnicos do departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, meu primeiro grupo de pesquisa, por me ensinarem a importância da BUSCA DA VERDADE, mesmo sabendo que eu nunca irei alcançá-la. Se hoje consigo chegar um pouco mais perto dela, é por ter assimilado conhecimentos e condutas com os quais tive contato neste grupo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, que desde o primeiro momento em que conversamos, quando eu procurava um Orientador que trabalhasse em uma linha que eu me identificasse, depositou confiança no meu trabalho. A partir de então, se tornou um COMPANHEIRO, e fui descobrindo que ele não era UM orientador que trabalhava em UMA linha de pesquisa que eu procurava, mas O orientador, em todo o sentido da palavra, que trabalhava NA linha de pesquisa que eu buscava. Se hoje eu tenho um imenso prazer em trabalhar no laboratório, sua contribuição foi fundamental.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e aos docentes do programa, pelos conhecimentos transmitidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela Bolsa de Estudos concedida.

Aos Docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Prof.^a Dr.^a Ângela Cristina Cilene Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Prof.^a Dr.^a Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César de Abreu Lima, Prof.^a Dr.^a Josimeri Hebling Costa, Prof.^a Dr.^a Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Loiola Cordeiro, agradeço pelos conhecimentos transmitidos e pela forma como me receberam no Departamento.

À Prof.^a Dr.^a Elisa Maria Aparecida Giro, pela qual tenho um carinho muito grande. Agradeço pelo tanto convívio no laboratório quanto

pelo acompanhamento durante o Estágio de Docência na Clínica da Graduação. Admiro-te muito como pessoa e como profissional.

À Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling, pelo auxílio no tratamento estatístico dos resultados deste trabalho e por sua disposição em ajudar sempre que precisei, em qualquer situação.

Aos Prof. Dr. Jaques E. Nör e ao Prof. Dr. Carl T. Hanks, por nos enviarem as células utilizadas nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Anthony J. Smith, pelas opiniões transmitidas e por ter fornecido as proteínas utilizadas neste estudo.

Aos funcionários do departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Célia, Cris, Dulce, Edinho (*in memorian*) Odete, Regina, Sylvia, Tânia e Totó, pelos momentos que desfrutamos desde a graduação.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Adriano, Ceres, Eliane, Inês, Maria, Maria José, Marley, Sílvia e Maria Helena, pelo carinho e dedicação ao longo da minha trajetória nesta Faculdade.

Aos Funcionários dos Setores de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: Fernanda, Jurandir, Zacharias, Guilherme, Mara, Rosângela e Vera pela disponibilidade em atender, mesmo quando eu solicitava os documentos com um pouco de atraso...

A todos os Funcionários da faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sem os quais seria impossível a realização de qualquer trabalho.

À Glorinha, pela dedicação ao laboratório e pela companhia ao longo destes dois anos.

Aos colegas de Mestrado, Érika, Fábio, Fabíola, Hermes, Jonas, Junia, M, Murilo e Thiago (*in memoriam*). Cada um de vocês contribuiu nestes dois anos, como colegas e como amigos, pessoal e profissionalmente.

Aos amigos das Repúblicas Pasta de Alho (Betinho, Cabelo, Pena e Manja) e Toca 62 (Abner, Michel, Japão e Otávio), amigos que me proporcionaram momentos de muita alegria e que vão ser sempre lembrados por mim. Espero que todos tenham muito sucesso.

Aos amigos do grupo de pesquisa de citotoxicidade e biocompatibilidade, Adriano, Kina, Dani, Giovanni, Mariana, Sabrina, Edinho, Célia, Cláudia, Andreza, Betinho e Junia. Juntos pudemos nos desenvolver a cada dia e espero que continuemos trabalhando por um bom tempo. Desejo o sucesso e o aprendizado constante para todos vocês.

Aos amigos que fiz na graduação e nos outros cursos de pós-graduação e especialização.

Aos companheiros de República André Sgremi, João, Paulo, Neto e Minor (de Menor), pela convivência ao longo deste ano.

À Fernandinha, pela companhia e apoio neste semestre decisivo. Sua presença tornou mais leves as dificuldades que enfrentei neste período.

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

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	11
2. Artigo 1	24
3. Artigo 2.....	42
4. Artigo 3.....	73
5. Considerações Finais.....	91
6. Referências	101
7. Resumo.....	114
8. Abstract.....	117

Introdução Geral

O uso de materiais na cavidade bucal com finalidade restauradora data de mais de 2000 anos. Apesar de alguns deles terem sido desenvolvidos há muito tempo e estarem ainda em uso, o avanço das pesquisas nas últimas décadas tem direcionado a uma preocupação cada vez maior não só com as propriedades mecânicas, mas também com a biocompatibilidade dos materiais dentários.

Biocompatibilidade pode ser definido como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro sem, contudo causar danos ou prejuízo ao mesmo. Hoje, o estudo da biocompatibilidade envolve não só os aspectos físicos e biológicos dos materiais, mas também os aspectos do tecido que está sendo substituído e tecidos adjacentes. Assim, antes de se inserir um material para substituir um tecido perdido, deve-se conhecer a estrutura e função deste tecido assim como as propriedades do material. Neste contexto, a ciência dos materiais dentários vêm sendo gradativamente substituída pela ciência dos biomateriais em Odontologia (STANLEY, 1985).

Após um preparo cavitário, seja ele decorrente de lesão de cárie ou não, é perdida uma certa quantidade de tecido dentinário, o qual deve ser substituído por um material que devolva a função e a estética ao elemento dental. Mesmo que um bom selamento tenha sido obtido através da restauração, bactérias (principalmente da família *Streptococci*)

(LOVE e JENKINSON, 2002) podem se multiplicar sob a mesma utilizando como substrato a “smear layer” (BRÄNNSTRÖM, 1986), invadir o complexo dentino-pulpar e liberar toxinas que podem se difundir para a polpa, resultando em irritação e inflamação, prejudicando o processo de reparo (COTTON, 1974). Logo, a utilização de um material biocompatível não garante, por si só, o sucesso da restauração.

Visando eliminar de maneira mais eficaz a microbiota patogênica remanescente após preparo cavitário, muitos autores têm procurado métodos de diferenciação da dentina infectada daquela não infectada através do uso de corantes (KIDD et al, 1993, FUSAYAMA, 1979, BOSTON e LIAO, 2004). Entretanto, Kidd et al (1993), demonstraram que o uso de um corante evidenciador não resulta na detecção de todas as bactérias presentes após o preparo cavitário. Assim, uma solução plausível para a eliminação destes microrganismos seria o uso de um agente desinfetante, o qual poderia ser aplicado na cavidade antes da restauração (BARATIERI, 1995). Em casos de exposição acidental do tecido pulpar durante um procedimento operatório, algumas soluções como água de hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio já vêm sendo utilizadas com a finalidade de reduzir o número de bactérias viáveis no local, e desta maneira tornar o prognóstico mais favorável. Porém, todas estas soluções apresentam efeitos citotóxicos de variada intensidade para células em cultura (COSTA et al, 2001), podendo prejudicar o reparo do complexo dentino-pulpar.

Alguns autores têm proposto o uso de soluções de clorexidina (CLX) antes da aplicação dos sistemas adesivos, com a finalidade de se reduzir o número de bactérias viáveis no local (CAUFIELD et al, 1981). Apesar do uso destas soluções não interferir na força de união micromecânica dos sistemas adesivos com o tecido dentinário (CASTRO et al, 2003), não existe na literatura evidência científica para comprovar sua biocompatibilidade com o complexo dentino-pulpar.

Por ser um agente antibacteriano de amplo espectro (EMILSON, 1977, BASRANI et al, 2002), sendo efetivo na eliminação de bactérias presentes na lesão de cárie (WICHT et al, 2004), a solução de CLX seria ideal para lavagem de cavidades caso apresentasse biocompatibilidade aceitável. Porém, estudos avaliando a citotoxicidade deste agente sobre fibroblastos de gengiva humana e células da linhagem HeLa demonstram que concentrações de CLX superiores a 0,01% podem afetar a viabilidade destas linhagens celulares (GOLDSCHIMIDT et al, 1977). Existem ainda, na literatura atual, estudos *in vitro* utilizando outros tipos de células que demonstram o efeito citotóxico da CLX (CHANG et al, 2001, HIDALGO e DOMINGUEZ, 2001). Todavia, pesquisas desenvolvidas com diferentes modelos podem apresentar resultados variados, mesmo que o agente em estudo seja o mesmo (HENSTEN-PETTERSEN e HELGELAND, 1981). Assim, por não existir nenhum dado avaliando o efeito da CLX sobre células pulpare, seria importante uma investigação tanto da citotoxicidade *in vitro* (sobre células de linhagem odontoblástica) quanto

da biocompatibilidade *in vivo* deste agente (visto que *in vivo* existem outros fatores como a barreira dentinária e fluido tecidual, que poderiam diminuir a citotoxicidade) antes que o mesmo seja indicado para os procedimentos clínicos de rotina.

A biocompatibilidade de materiais dentários utilizados na restauração de cavidades, forramento cavitário ou mesmo como material de capeamento, também é uma variável que afeta diretamente o prognóstico de determinados procedimentos clínicos. A profundidade da cavidade é um fator que deve ser avaliado antes da escolha do material restaurador, visto que a resposta pulpar é dependente da mesma (HEBLING et al, 1999). Principalmente nos casos de cavidades profundas, a preocupação em relação à biocompatibilidade do material é maior, devido à proximidade do mesmo com o tecido pulpar.

Recentemente, alguns estudos *in vivo* realizados em dentes de em cães (GIANTANTZOPOULOU et al, 1994), macacos (TARIM et al, 1998) e mesmo em dentes humanos (COSTA et al, 2003c) demonstraram que o cimento de ionômero de vidro VB (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) é biologicamente aceitável mesmo quando a espessura de dentina remanescente é menor que 300 μ m (COSTA et al, 2003c).

Os Cimentos de Ionômero de Vidro (CIVs) são materiais constituídos de pó de cristais de flúor-alumínio-silicato de estrôncio ou cálcio (base) combinados com copolímeros ácidos solúveis em água (ácido). Este material, desenvolvido em 1969, foi introduzido na

Odontologia no início dos anos 70 (CROLL e NICHOLSON, 2002). Devido a sua versatilidade, este material ionomérico tem sido intensamente utilizado na Odontologia para variados procedimentos operatórios, tais como selamento de fôssulas e fissuras, forramento cavitário, cimentação de coroas e bandas ortodônticas, colagem de brackets ortodônticos, capeamento pulpar indireto e para restauração de cavidades dentárias (BERG, 2002).

No final da década de 80, visando o desenvolvimento de um material restaurador com propriedades mecânicas superiores às dos CIVs, mantendo sua capacidade de liberar e armazenar flúor e outras características interessantes e próprias dos materiais ionoméricos, pesquisadores adicionaram componentes resinosos aos CIVs convencionais. Este novo material foi avaliado quanto às propriedades mecânicas, as quais se mostraram superiores às dos CIVs convencionais (MATHIS e FERRACANE, 1989). A partir de então, os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs) tiveram suas propriedades físicas e biológicas amplamente avaliadas. A principal diferença entre os CIVMRs e os CIVs foi a adição, no líquido, do monômero resinoso 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), iniciadores e ativadores solúveis em água, os quais são os principais componentes responsáveis pela polimerização do material (WILSON, 1991). Sendo assim, a matriz dos CIVMRs passou a ser constituída de partículas de

vidro embebidas em uma matriz de poliácidos e monômeros polimerizados.

A adição deste componente resinoso ao CIV original levou a um aumento da sua citotoxicidade (OLIVA et al, 1996). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que o HEMA puro é altamente citotóxico (HANKS et al, 1991, RATANASATHIEN et al, 1995) e que este monômero resinoso apresenta capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários, podendo atingir células pulpares (BOUILLAGUET et al, 1996). Também, tem sido demonstrado que os CIVMRs são mais citotóxicos que os CIVs convencionais, principalmente devido a liberação deste monômero e de outros agentes ácidos que compõem este material ionomérico resinoso (OLIVA et al, 1996). O efeito citotóxico superior para os CIVMRs em relação aos CIVs sobre células de linhagem odontoblástica já foi demonstrado *in vitro* (COSTA et al, 2003b).

Porém, como relatado anteriormente, em uma pesquisa realizada em dentes humanos, após utilização do CIVMR VB como agente forrador de cavidades bastante profundas, foi demonstrado que este material é biocompatível, podendo ser recomendado para esta finalidade clínica (COSTA et al, 2003c). No caso de exposições pulpares, estudo realizado em dentes de ratos (COSTA et al, 2003a) demonstrou a ocorrência de intensa reação inflamatória inicial, a qual regrediu com o decorrer dos períodos. Aos 60 dias, as polpas dos animais capeadas com o material ionomérico experimental apresentava reparação tecidual completa

associada à deposição de ampla barreira de tecido duro. Por outro lado, pesquisa desenvolvida em dentes humanos (NASCIMENTO et al, 2000) demonstrou que este material não é apropriado para procedimentos de capeamento pulpar direto. Os autores sugeriram que a falta de reparação pulpar possa ter ocorrido devido à elevada solubilidade do material em meio úmido. Este fato pode ter sido responsável pela intensa liberação de componentes tóxicos do CIVMR experimental, os quais atingiram áreas profundas da polpa, desencadeando resposta inflamatória crônica mediada por macrófagos e células gigantes.

Tendo como base os trabalhos citados e de acordo com as recomendações dos fabricantes, os CIVs e CIVMRs disponíveis no mercado Odontológico são indicados apenas para aplicação direta sobre dentina, a qual é constituída, em volume, por 50% de minerais na forma de cristais de apatita ricos em carbonato e deficientes de cálcio, 30% de material orgânico (principalmente colágeno tipo-1), e 20% de fluido semelhante ao plasma (MARSHALL et al, 1997). Devido a presença do fluído dentinário nas paredes cavitárias, é de se esperar que após aplicação de CIV sobre a estrutura úmida da dentina, este material possa sofrer dissolução. Assim, componentes ácidos, monômeros residuais e outros componentes de baixo peso molecular solúveis em ambiente úmido poderiam ser liberados para se difundir através dos túbulos dentinários para alcançar o espaço pulpar. Talvez, com o decorrer do tempo, esta dissolução seja contínua. Então, maior concentração de

componentes do CIV poderiam se deslocar através da dentina para causar sérios danos ao tecido pulpar.

Desta maneira, torna-se importante não apenas a avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade dos CIVs e CIVMRs contemporâneos, mas também é de interesse determinar a possibilidade de ocorrer liberação, contínua ou não, de componentes destes materiais dentários amplamente utilizados na Odontologia moderna, quando colocados em contato com meio aquoso.

Na verdade, um material ideal de capeamento pulpar direto ou indireto seria aquele que não fosse apenas biocompatível com o tecido pulpar, mas também indutor da atividade secretora das células pulpares para que ocorresse a síntese e secreção de matriz dentinária para dar origem a uma nova barreira de tecido duro. Os fatores de crescimento extraídos da própria dentina ou sintetizados através da técnica do DNA recombinante parecem ser uma alternativa promissora, visto que diversos estudos *in vitro* (IOHARA et al, 2004, SAITO et al, 2004, YOKOSE et al, 2004, HE et al, 2004) e *in vivo* (SMITH et al, 1994, SMITH et al, 2001, TZIAFAS et al, 1995, LOVSCHALL et al, 2001, SIX et al, 2002, HU et al, 1998) comprovaram que os mesmos possuem atividade bioestimuladora sobre células pulpares.

Acerca da presença de fatores de crescimento na matriz dentinária, um estudo detalhado investigando a composição orgânica da matriz dentinária foi realizado por Jones e Leaver (1974). Os autores isolaram a

fração não colagenosa desta estrutura através da desmineralização com EDTA seguida por digestão com colagenase. Em ambos procedimentos foi realizada diálise para isolamento dos componentes da dentina. As bandas protéicas foram isoladas através de focalização isoelétrica e eletroforese em gel e comparadas com um controle utilizando proteínas não colagenosas da matriz óssea obtidas da mesma forma. Foram encontrados aproximadamente 20 componentes na fração isolada da dentina humana, sendo que a distribuição das bandas revelou que existem proteínas distintas nos dois tecidos. Posteriormente, outros estudos demonstraram que dentre as proteínas presentes na matriz dentinária, algumas se apresentavam como membros da família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (BUTLER et al, 1977, KAWAI e URIST, 1989, URIST, 1965). Foram encontrados ainda outros fatores de crescimento como Insuline-like growth factor I e II (IGF-I e IGF-II) e transforming growth factor- β (TGF- β) (FINKELMANN et al, 1990)

A presença de fatores de crescimento na composição da dentina levou vários pesquisadores a investigarem o efeito destas proteínas bioativas sobre o tecido pulpar (SMITH et al, 1994, SMITH et al, 2001, TZIAFAS et al, 1995, LOVSCHALL et al, 2001, SIX et al, 2002, HU et al, 1998). Tais estudos demonstraram que os fatores de crescimento, sejam eles extraídos da dentina de animais (SMITH et al, 1994, SMITH et al, 2001, TZIAFAS et al, 1995), ou sintetizados por meio da técnica de DNA recombinante (LOVSCHALL et al, 2001, SIX et al, 2002, HU et al, 1998)

induzem a síntese e secreção de dentina terciária reacional (SMITH et al, 1994, SMITH et al, 2001) ou reparadora (TZIAFAS et al, 1995, LOVSCHALL et al, 2001, SIX et al, 2002, HU et al, 1998) quando utilizados como material de capeamento pulpar indireto ou direto, respectivamente.

Entretanto, os estudos *in vivo* nos fornecem apenas a evidência de que estas proteínas estimulam os odontoblastos a secretarem matriz de dentina, mas não evidenciam e esclarecem o mecanismo pelo qual tais moléculas exercem este efeito. Os trabalhos realizados *in vitro* permitem uma investigação mais aprofundada dos mecanismos e das vias metabólicas envolvidas na regulação da expressão gênica mediada por fatores de crescimento ou da resposta das células a estímulos agressores de origem microbiana (TELLES et al, 2003)

Apesar de Smith et al (1995) terem demonstrado que o estímulo para a síntese e secreção de dentina reacional possa ser proveniente de componentes teciduais endógenos liberados da matriz de dentina durante o processo patológico, estudos atuais realizados *in vitro* têm voltado seu foco de investigação para o uso de fatores de crescimento isolados (IOHARA et al, 2004, SAITO et al, 2004, YOKOSE et al, 2004, HE et al, 2004). Então, é importante determinar o efeito do extrato total de proteínas bioativas extraídas da dentina para que posteriormente sejam determinados os mecanismos de ação de cada um dos fatores de

crescimento isolados, a fim de se obter informações gerais ou específicas sobre os efeitos dos fatores de crescimento sobre os odontoblastos.

Tendo em vista a problemática atual do uso de soluções de lavagem de cavidades e materiais restauradores sobre o complexo dentino-pulpar, a proposta do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de CLX, a citotoxicidade e biocompatibilidade de diferentes cimentos de ionômero de vidro, e o efeito do concentrado de proteínas extraídas da dentina de coelhos (ESDP) sobre células de linhagem odontoblástica.

Desta maneira, estão apresentados nesta Dissertação de Mestrado, três artigos científicos preparados para publicação em periódicos de forte impacto para a área de conhecimento. Os artigos 1 e 3 obedecem as normas do periódico *Operative Dentistry* (Editor: Dr. Michael A. Cochran, ***Operative Dentistry***, Indiana University School of Dentistry, Room S411, 1121 West Michigan Street, Indianapolis, IN 46202-5186; Fone (317) 278-4800 ; fax (317) 278-4900; e-mail: editor@jopdent.org), sendo que o artigo 2 segue as recomendações do periódico *Biomaterials* (Editor: Professor D. F. Williams, ***Biomaterials***, University of Liverpool, Professor of Tissue Engineering and Head of the Department of Clinical Engineering, Liverpool, L69 3BX, UK. E-mail: dfw@liverpool.ac.uk).

Título: Efeito citotóxico da clorexidina sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

Autores:

Pedro Paulo Chaves de Souza, DDS, Universidade Estadual Paulista / UNESP, Faculdade de Odontologia , Araraquara, Brasil

*Carlos Alberto de Souza Costa, DDS, MS, PhD, Universidade Estadual Paulista / UNESP, Faculdade de Odontologia, Araraquara, Brasil

***Autor Correspondente:**

Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Universidade Estadual Paulista, Araraquara – Faculdade de Odontologia

Rua Humaitá, 1680, Centro, CEP: 14801-903 / CP:331

Araraquara, São Paulo

Brasil

Fone: (16)33016478

Fax: (16)33016488

e-mail: casouzac@foar.unesp.br.

***Efeito citotóxico da clorexidina sobre células de linhagem
odontoblástica MDPC-23***

Relevância Clínica

A determinação da concentração não citotóxica de uma solução de clorexidina como um agente para lavagem de cavidades é essencial antes que esta solução seja recomendada para esta finalidade sem causar danos às células pulpares.

Resumo

Este estudo *in vitro* avaliou a citotoxicidade de soluções de clorexidina em diferentes concentrações sobre células imortalizadas de linhagem odontoblástica. Para esta análise, células da linhagem MDPC-23 foram cultivadas em placas de acrílico de 24 compartimentos (30.000 células/cm²) e mantidas em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar. Após 72 horas, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 900µl de meio de cultura fresco adicionado de 20µl de soluções contendo diferentes concentrações de clorexidina (0,12%, 0,2% e 1%) ou soluções controle negativo (tampão fosfato) e positivo (H₂O₂ 3%). Após 120 minutos de exposição das células às soluções em teste, foi realizado o ensaio de MTT para avaliação da atividade mitocondrial. As soluções de clorexidina reduziram a atividade mitocondrial em 24,85%, 29,93% e

70,84%, respectivamente, nas concentrações de 0,12%, 0,2% e 1%. Assim, foi possível concluir que as soluções de clorexidina são citotóxicas para as células da linhagem MDPC-23, sendo que esta citotoxicidade é dose-dependente.

Introdução

O desenvolvimento de novas estratégias para a terapia pulpar visando a manutenção da vitalidade do complexo dentino-pulpar tem sido foco de um grande número de pesquisadores (Ishizaki & others, 2003; Tziafas, Smith & Lesot, 2000). Muitos estudos têm demonstrado que a polpa dental tem uma capacidade inerente de responder a agressões, formando barreira mineralizada e em alguns casos dentina tubular (Smith & others, 1995). Entretanto, vários fatores podem influenciar negativamente a capacidade de resposta do complexo dentino-pulpar quando da ocorrência de uma injúria tecidual, como o material a ser utilizado ou a contaminação por microrganismos.

Têm sido descrito que a contaminação bacteriana pode prejudicar ou mesmo impedir o processo de reparação do tecido pulpar agredido (Watts & Paterson, 1987). Deste modo, a infecção bacteriana é uma variável importante que interfere negativamente na reparação pulpar. Um estudo realizado por Cotton (1974), demonstrou que quando capeadas com um determinado material dentário, polpas infectadas apresentam resposta tecidual mais intensa do que o tecido pulpar livre de contaminação

bacteriana. Um grupo relativamente pequeno e seletivo de bactérias presentes nas lesões de cárie têm a capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários para alcançar o espaço pulpar, e então causar intensa resposta inflamatória tecidual (Love & Jenkinson, 2002).

Mesmo após a remoção clínica de todo o tecido cariado, ocorre a formação, sobre as paredes cavitárias, de uma camada heterogênea composta por restos de estrutura do esmalte cortado, debris de dentina, água, parte de prolongamentos citoplasmáticos e outros. Nesta situação clínica, é evidente que bactérias residuais também passam a compor esta camada residual superficial denominada de “smear layer”, a qual tem a capacidade de penetrar no interior dos túbulos dentinários para originar os “smear plugs”. Nestes locais, os microrganismos podem se dividir e preencher o espaço intratubular (Meiers & Kresin, 1996), dando continuidade ao processo de evolução da cárie. Por este motivo, tanto em casos de exposição pulpar quanto em cavidades preparadas removendo-se o tecido cariado, seria importante a lavagem do local com soluções antibacterianas, para eliminar, ou pelo menos reduzir, a quantidade de microrganismos viáveis. Nos casos de exposição pulpar, algumas soluções como água de hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio são utilizadas com esta finalidade, mas todas estas soluções apresentam efeitos citotóxicos, de variada intensidade, para células em cultura (Costa & others, 2001).

Para prevenir que bactérias viáveis permaneçam sobre a “smear layer” e dentina afetada por cárie, e com o objetivo de evitar que estes microrganismos possam se difundir através dos túbulos dentinários, algumas soluções desinfetantes com baixo efeito citotóxico poderiam ser utilizadas para lavagem das paredes cavitárias antes de se realizar a restauração. Por ser um agente antibacteriano de amplo espectro (Emilson, 1977; Basrani & others, 2002) e apresentar efetividade contra uma vasta gama de microrganismos presentes nas lesões de cárie (Cervone & others, 1990), a clorexidina (CLX) parece ser uma substância química adequada para ser aplicada após preparo cavitário para prevenir a proliferação bacteriana sob as restaurações. Um estudo *in vitro* utilizando CLX demonstrou que este medicamento é efetivo na redução dos níveis de *Streptococcus mutans* em superfícies radiculares cariadas expostas (Fure & Emilson, 1990). Vale lembrar que bactérias da família *Streptococci* são as mais comumente encontradas invadindo o complexo dentina-polpa (Love & Jenkinson, 2002).

Além da propriedade antimicrobiana, pesquisas têm demonstrado que a solução de CLX pode ser utilizada para lavagem de cavidades antes de restaurações de resina sem afetar as propriedades de união micromecânica dos sistemas adesivos com o tecido dentinário (Meiers & Kresin, 1996; de Castro & others, 2003). Entretanto, a difusão da CLX através dos túbulos de dentina e seus efeitos citotóxicos quando em contato com as células pulpares são desconhecidos.

Assim, se torna importante determinar os efeitos citotóxicos, mesmo que preliminares, da CLX quando em contato com células de linhagem odontoblástica. Para determinar a citotoxicidade de soluções recomendadas para lavagem de exposições pulpares (Costa & others, 2001) e de materiais sólidos, como resinas compostas (Costa & others, 2003a) e cimentos ionoméricos (Costa & others, 2003b) a técnica de MTT (Mosmann, 1983) tem sido a mais amplamente utilizada.

Portanto, a utilização da técnica de MTT poderá determinar os possíveis efeitos citotóxicos de diferentes concentrações de CLX quando aplicadas sobre células de linhagem odontoblástica cultivadas. Os resultados a serem obtidos poderão direcionar o desenvolvimento de uma determinada solução que possa atender às variadas propriedades de uma solução de lavagem ideal. Sendo assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade de soluções de CLX em diferentes concentrações, determinando se o efeito citotóxico é dose-dependente.

Material e métodos

Manutenção das células MDPC-23 em cultura.

Células odontoblastóides da linhagem MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino

(SFB, Cultilab, Campinas, SP), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em incubadora com atmosfera umedecida contendo CO₂ a 5% e na temperatura de 37°C, sendo subcultivadas a cada 3 dias até o dia do experimento. O subcultivo foi obtido a partir do deslocamento das células das garrafas de 75cm² (solução salina tamponada com fosfato - PBS1X + EDTA 0,01M - 2 minutos a 37°C) e repique destas células para uma nova garrafa plástica contendo o meio de cultura DMEM completo. Este procedimento foi realizado até que se obtivesse o número de células suficiente para a realização do experimento.

Células da linhagem MDPC-23 foram suspensas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e distribuídas em placas de plástico esterilizadas com 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) na densidade de 3x10⁴ células/cm² e incubadas por 72 horas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e na temperatura de 37°C. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e uma nova solução foi aplicada em cada compartimento. Esta solução era composta por 980µL de meio de cultura contendo 10% de SFB e 20µL de CLX em diferentes concentrações. A seguinte divisão de grupos foi obedecida: G1 – (PBS1X, controle negativo); G2 – CLX 0,12%; G3 – CLX 0,2%; e G4 – CLX 1% e G5 – H₂O₂ 3% (controle positivo).

Após 120 minutos de exposição das células às diferentes concentrações de CLX, e das soluções controle, estas foram aspiradas e

substituídas em cada compartimento por 900µl de meio de cultura completo contendo 10% de soro fetal bovino e 100µl de solução de MTT (5mg/ml em PBS1X). As células foram incubadas em contato com esta nova solução pelo período de 4 horas na temperatura de 37°C. Em seguida, o meio de cultura contendo a solução de MTT foi removido e foram adicionados 700µl da solução de isopropanol acidificado (0,04N de HCl). A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570nm em leitor de ELISA (ELX 800 – Universal Microplate Reader- BIOTEK Instruments, ICC, USA). Os resultados numéricos obtidos foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis complementada pelo Teste de Dunn.

Resultados

Devido à não distribuição normal dos valores de metabolismo celular (Kolmogorov - Smirnov, $p < 0.05$) testes não paramétricos (Kruskal-Wallis e Método de Dunn) foram aplicados.

O método de Kruskal Wallis aplicado para a comparação entre os grupos demonstrou haver diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,001$). Estas diferenças foram identificadas comparando-se os grupos dois a dois através da aplicação do Método de Dunn.

Desta maneira, foi demonstrado não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos CLX 1% e H₂O₂ 3% (controle positivo). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre estes dois grupos e os grupos CLX 0,12% e CLX 0,2%, os quais se mostraram estatisticamente iguais entre si, porém estatisticamente diferentes do controle negativo PBS1X ($p < 0,05$). O ranking de citotoxicidade para todas as concentrações de CLX avaliadas quando comparadas às soluções controle, em ordem decrescente, foi: H₂O₂ 3% = CLX 1% > CLX 0,2% = CLX 0,12% > PBS1X. O experimento de MTT revelou um efeito dose-dependente das soluções de CLX avaliadas. A redução no metabolismo celular para os grupos CLX 0,12%; CLX 0,2%; e CLX 1% foi 24,85%; 29,93%; e 70,84%, respectivamente, sendo que o grupo tratado com H₂O₂ 3% apresentou redução de 86,61% no metabolismo das células MDPC-23. O gráfico de barras representativo do experimento de MTT está demonstrado na figura 1.

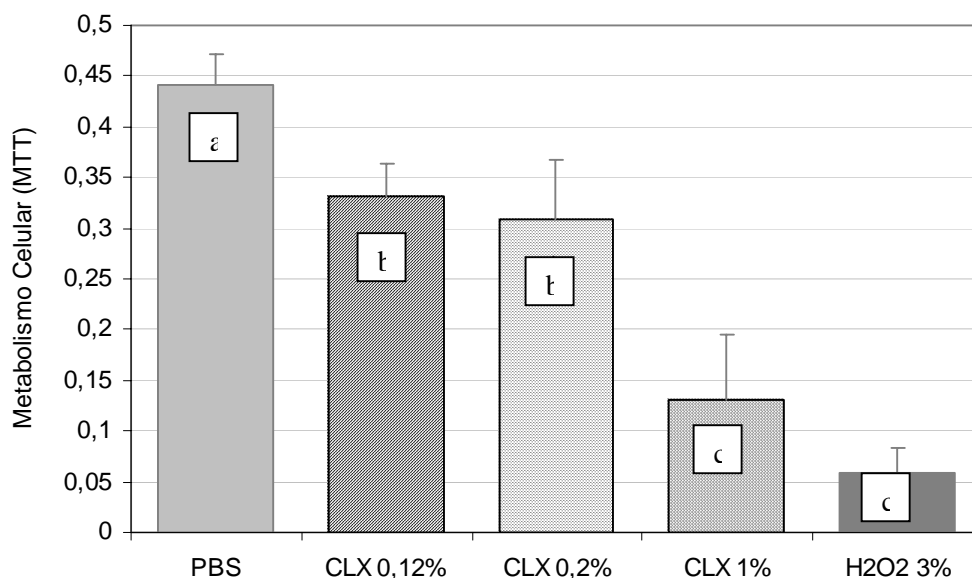


Figura 1. Gráfico de barras representativo das médias de metabolismo celular (MTT) para a linhagem MDPC-23, observadas para os grupos experimentais (barra = DP). Colunas com letras diferentes significam médias estatisticamente diferentes (Método de Dunn).

Discussão

A clorexidina é uma bisbiguanida catiônica com propriedades bacteriostática (em baixas concentrações) e bactericida (em altas concentrações) contra uma vasta gama de microrganismos (Emilson, 1977). A aplicação clínica da CLX como agente antiplaca e antigengivite é amplamente aceita (Matthigs & Adriaens, 2002). Atualmente, este agente tem sido utilizado como desinfetante de paredes cavitárias, o qual é aplicado antes de se realizar restaurações com resina composta, não afetando na força de adesão (de Castro & others, 2003). Entretanto, vários estudos sugerem que a CLX afeta a proliferação e viabilidade celular. Mesmo em baixas concentrações, CLX é tóxica quando em

contato com células eucarióticas (Goldshmidt & others, 1977). Estes autores demonstraram que fibroblastos de gengiva humana em cultura e células da linhagem HeLa são afetadas por diferentes concentrações de CLX, tais como 0,01% ou superiores. A exposição destas células a este agente a 0,01% aumentou a liberação de ^{51}Cr , como verificado no experimento de liberação de cromo em 87% e 67% para fibroblastos gengivais e HeLa, respectivamente. Este dado confirma a alta citotoxicidade da CLX.

Recentemente, outro estudo *in vitro* (Chang & others, 2001) utilizando células do ligamento periodontal humano avaliou a viabilidade celular após exposição das mesmas a concentrações de CLX variando de 0,0001% a 0,1%. Foi confirmado que este agente, na concentração de 0,0001%, diminuiu em 25% a atividade mitocondrial após 2 horas de exposição. No grupo tratado com CLX a 0,125%, a atividade mitocondrial foi quase que completamente inibida. Na presente investigação, as células da linhagem MDPC-23 em cultura foram expostas a baixas concentrações de CLX. Nos grupos 1, 2 e 3, após a diluição do agente experimental no meio de cultura, a concentração final foi de 0,0024%, 0,004% e 0,02%, respectivamente. A redução na atividade mitocondrial após 2 horas de exposição na concentração final de 0,0024% (CLX 0,12%) foi de 24,85%. Quando confrontamos nossos dados com aqueles obtidos por Chang & others (2001), em que houve uma redução na atividade mitocondrial de 25% após exposição das células do ligamento

periodontal à CLX na concentração de 0,0001%, podemos especular que tais células são mais sensíveis em relação às células MDPC-23. Apesar do mesmo ensaio e tempo de exposição terem sido utilizados nos dois estudos, a exposição das células ao agente foi realizada 24 horas após o subcultivo das células do ligamento periodontal, o que caracteriza uma densidade celular baixa. Na presente pesquisa, as células MDPC-23 foram expostas às concentrações experimentais de CLX 72 horas após o subcultivo, quando as células já estavam em confluência, as quais apresentam a taxa de mitose menor que as células em baixa densidade. Desta forma, podemos especular que as células são mais sensíveis à CLX durante a fase de proliferação rápida. Entretanto, este dado deve ser investigado em estudos posteriores.

Hidalgo e Dominguez (2001) investigaram os efeitos citotóxicos da CLX utilizando três diferentes métodos visando a elucidação do mecanismo pelo qual a CLX pode causar alterações bioquímicas nos fibroblastos epiteliais humanos. Os autores sugeriram que a inibição do crescimento celular é devida à redução na atividade da desidrogenase succínica e da síntese de DNA. Talvez, a inibição da síntese de DNA possa ser um fator que explique a maior citotoxicidade das soluções de CLX quando aplicadas sobre células em densidade baixa.

Acerca da aplicação de CLX como desinfetante cavitário, deve ser considerado que a dentina é uma barreira que protege as células pulpares, particularmente os odontoblastos, contra os efeitos tóxicos de

materiais e soluções. Já é bem estabelecido na literatura que a barreira dentinária é um fator importante que faz com que os resultados obtidos de experimentos *in vitro* não possam ser extrapolados para as condições clínicas. Não existem dados científicos que determinem a capacidade de difusão da CLX através dos túbulos dentinários atualmente na literatura. Entretanto, pode-se sugerir que a concentração das soluções de CLX que porventura possam alcançar o espaço pulpar seja menor que aquela aplicada nas paredes cavitárias. A difusão dos componentes dos materiais dentários parece depender da profundidade da cavidade (Costa & others, 2003c). Estudos *in vivo* realizados em dentes humanos demonstraram relação direta entre a biocompatibilidade e a espessura de dentina remanescente (Costa & others, 2003c). Conseqüentemente, a determinação da concentração não citotóxica da solução desinfetante, a qual mantém a propriedade antibacteriana prevenindo a injúria à polpa, mesmo em cavidades profundas, deve ser determinada para que sua recomendação como solução de lavagem apropriada seja baseada em evidências científicas. Os resultados da presente pesquisa demonstraram que as concentrações de 0.0024% e 0,004% causaram baixos efeitos citotóxicos. Neste caso, se estas concentrações ainda apresentarem atividade antibacteriana e não interferirem na resistência de união, pode-se sugerir que futuras investigações sejam realizadas para se determinar a solução ideal de lavagem da estrutura dentinária para diferentes procedimentos clínicos onde este tecido tubular especializado é exposto.

Conclusão

Baseado nas condições experimentais utilizadas, pode-se concluir que as soluções de CLX na concentração de 0,12% e 0,2% apresentaram baixo efeito citotóxico quando aplicadas sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Todavia, CLX 1% causou intenso efeito citotóxico, comparável ao grupo controle positivo. Isto determinou que o efeito citotóxico da CLX sobre células MDPC-23 é dose-dependente.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (Proc. 02/12504-9) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 520027/00-00).

Referências

Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, Lawrence HP, Friedman S (2002) Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. **94(2)** 240-245.

Cervone F, Tronstad L, Hammond B (1990) Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivery system. *Endodontics & Dental Traumatology*. **6(1)** 33-36.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY (2001) The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*,. **92(4)** 446-450.

Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT (2001) Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *American Journal of Dentistry*. **14(1)** 25-30

Costa CAS, Hebling J, Hanks CT (2003a) Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent*. **28(4)** 365-70

Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT (2003b) *In vitro* cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*. **24(21)** 3853-8.

Costa CAS, Giro EMA, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J (2003c) Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dental Materials* **19(8)**:739-46.

Cotton WR (1974) Bacterial contamination as a factor in healing of pulp exposures. *Oral Surgery, Oral Oedicine, and Oral Pathology*. **38(3)** 441-450.

De Castro FL, de Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ (2003) Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *The Journal of Adhesive Dentistry*. **5(2)** 129-138.

Emilson CG (1977) Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scandinavian Journal of Dental Research* **85(4)** 255-265.

Fure S, Emilson CG (1990) Effect of chlorhexidine gel treatment supplemented with chlorhexidine varnish and resin on mutans streptococci and Actinomyces on root surfaces. *Caries Research*. **24(4)** 242-247.

Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S (1977) Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. *Journal of periodontology* **48(4)** 212-5.

Hidalgo E, Dominguez C (2001) Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicology In Vitro*. **15(4-5)** 271-276.

Ishizaki NT, Matsumoto K, Kimura Y, Wang X, Yamashita A (2003) Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *Journal of Endodontics*. **29(3)** 176-179

Love RM, Jenkinson HF (2002) Invasion of dentinal tubules by oral bacteria *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 13(2) 171-83.

Matthijs, S, Adriaens, PA (2002) Chlorhexidine varnishes: a review. *Journal of Clinical Periodontology*. **29** 1-8.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 16;65(1-2):55-63.

Meiers JC, Kresin JC (1996) Cavity disinfectants and dentin bonding. *Operative Dentistry* **21(4)** 153-159.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*. **39(1)** 273-280.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* **28(2)** 77-92.

Watts A, Paterson RC (1987) Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **64(4)** 466-474.

Página título: Citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* de diferentes cimentos de ionômero de vidro.

Informação sobre os autores:

Pedro Paulo Chaves de Souza^a

Carlos Alberto de Souza Costa^{b*}

^aUniversidade Estadual Paulista, UNESP

Faculdade de Odontologia, Departamento de Fisiologia e Patologia

Rua Humaitá, 1680 – CEP: 14801-903, Araraquara, SP, Brasil

^bUniversidade Estadual Paulista, UNESP

Faculdade de Odontologia, Departamento de Clínica Infantil

Rua Humaitá, 1680 – CEP: 14801-903, Araraquara, SP, Brasil

Título curto: Citotoxicidade e biocompatibilidade de cimentos de ionômeros de vidro.

***Autor correspondente:**

Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Universidade Estadual Paulista, Araraquara – Faculdade de Odontologia

Rua Humaitá, 1680, Centro, CEP: 14801-903 / CP:331

Araraquara, São Paulo

Brasil

Fone: (16)33016478

Fax: (16)33016488

e-mail: casouzac@foar.unesp.br

Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de diferentes cimentos de ionômero de vidro

Resumo

Este estudo teve a finalidade de avaliar a citotoxicidade *in vitro* e a biocompatibilidade *in vivo* de diferentes cimentos de ionômero de vidro modificados por resina. Para a avaliação *in vitro*, células da linhagem MDPC-23 foram cultivadas em placas de acrílico de 24 compartimentos (30.000 células/cm²) em meio de cultura DMEM completo. Corpos-de-prova preparados com os seguintes materiais: Vitrebond (VB); Vitremer (VM); e RelyX Luting Cement (RX) com dimensões padronizadas foram mantido por 24, 48 e 72 horas em 1,1mL de meio de cultura sem soro fetal bovino. Após 72 horas, o meio de cultura das placas contendo as células foi aspirado e substituído por 1 ml do meio de cultura condicionado com os materiais experimentais (eluato). Após 24 horas de contato das células com o eluato, o metabolismo celular foi avaliado pelo teste de MTT. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística de Kruskal-Wallis, complementada pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Para o estudo *in vivo*, tubos de polietileno preenchidos com os materiais experimentais foram implantados no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Os seguintes eventos histológicos: 1) espessura da cápsula fibrosa; 2) reação inflamatória; e 3) presença de macrófagos e células gigantes foram avaliados em microscopia de luz. Os resultados do teste *in vitro*

demonstraram que, para o grupo VB, houve redução da atividade mitocondrial de cerca de 85% para todos os períodos. VM e RX (24 horas de exposição) provocaram redução na atividade mitocondrial de 25,2% e 21,2%, respectivamente. Para o período de 48 horas, houve redução de 37,5% e 31,5% para VM e RX, respectivamente, resultados que se mostraram estatisticamente iguais para o período de 72 horas, para ambos materiais. O estudo *in vivo* não detectou diferença entre os materiais em relação aos parâmetros avaliados e demonstrou que todos são biocompatíveis. Conclui-se que os diferentes materiais são citotóxicos em diferentes intensidades para as células MDPC-23 em cultura, sendo esta citotoxicidade é maior quanto maior o período de exposição dos mesmos ao meio de cultura. Conclui-se também que estes materiais são biocompatíveis quando implantados no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

1. Introdução

Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) são materiais dentários bastante utilizados para uma vasta gama de aplicações clínicas [1]. Esta popularidade é devida ao fato de que os CIVs reúnem uma série de interessantes propriedades, as quais são requeridas para um material restaurador ideal, tais como: liberação de flúor [2]; coeficiente de expansão térmica similar ao da dentina [3]; adesão ao esmalte e à dentina [4]; e biocompatibilidade [5, 6]. Apesar destas vantagens, os CIVs

convencionais possuem deficiências como materiais restauradores, devido a sua susceptibilidade à desidratação [7] e propriedades físicas e mecânicas limitadas, tais como alta solubilidade [8] e extenso tempo de presa [9, 10].

Visando melhorar as propriedades físicas e mecânicas dos CIVs e facilitar a aplicação clínica destes materiais, monômeros hidrofílicos e foto-iniciadores foram adicionados ao ácido poli(acrílico) e ao pó de vidro, dando origem aos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs) [11]. Os componentes resinosos, foto-iniciadores e agentes inorgânicos bem como suas composições variam entre os CIVMRs existentes no mercado atualmente [12, 13].

A adição de componentes resinosos melhorou o tempo de trabalho e de presa e aperfeiçoaram as propriedades físicas e mecânicas destes novos materiais [14, 15]. Entretanto, vários estudos *in vitro* demonstraram que os CIVMRs apresentam efeitos citotóxicos superiores aos CIVs convencionais [16, 17]. Esta alta citotoxicidade dos CIVMRs parece ser decorrente de componentes resinosos incorporados aos materiais, tal como o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), o qual é o componente resinoso mais comumente adicionado na composição da maioria dos CIVMRs [11].

Estudos prévios realizados *in vitro* também demonstraram que o HEMA pode se difundir através dos túbulos dentinários [18] e causar altos efeitos citotóxicos [19, 20]. Conseqüentemente, é de se esperar que os CIVMRs devam causar reação inflamatória severa quando aplicados em

contato com tecido conjuntivo. Entretanto, estudos *in vivo* realizados em cães [21], primatas [22, 23] e mesmo em dentes humanos [5] demonstraram que os CIVMRs são biologicamente aceitáveis. Os resultados contraditórios obtidos em estudos *in vivo* e *in vitro* já foram anteriormente demonstrados e discutidos na literatura [24, 25]

Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos citotóxicos de diferentes CIVMRs aplicados sobre células odontoblastóides da linhagem MDPC-23 e a biocompatibilidade destes materiais implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

2. Material e Métodos

2.1. Ensaio de MTT

Três cimentos de ionômero de vidro modificados por resina: Vitremer (VM); Vitrebond (VB); e RelyX Luting Cement (RX) (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), foram investigados neste estudo. A composição dos materiais bem como sua proporção pó-líquido em peso estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos materiais e proporção pó-líquido em peso.

Material	Composição	Proporção pó-líquido (peso/peso)
Vitremer 3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Pó: Pó de vidro; cloreto de difenil-iodíneo. Líquido: álcool etílico 35-45%; copolímero de ácido itacônico e acrílico 10-15%; 2-hidroxietil-metacrilato 45-55%.	2,5/1
Vitrebond 3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Pó: pó de vidro (O, SrO, criolyte, NH ₄ F, MgO, P _s O); 2% cloreto de difenil-iodíneo. Líquido: água 30-40%; copolímero de ácido itacônico e acrílico 35-45%; 2-hidroxietil-metacrilato 20-30%.	1,4/1
RelyX Luting Cement 3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Pó: pó de fluoralumínio-silicato; ácido ascórbico; persulfato de potássio; agente opacificante. Líquido: água 30-40%; copolímero de ácido itacônico e acrílico 30-40%; 2-hidroxietil-metacrilato 25-35%.	1,6/1

Trinta corpos-de-prova de cada material experimental (2mm de espessura por 4 mm de diâmetro) foram preparados utilizando-se uma matriz metálica bipartida. Os materiais foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante, incluindo a proporção pó-líquido (em peso) e inseridos na matriz metálica. Os espécimes dos materiais VM e VB foram fotoativados utilizando uma fonte de luz halógena (Curing Light XL3000, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) por 30 segundos. A intensidade

de luz (410 mW/cm^2) foi monitorada por um radiômetro (Optilux 500, Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA). Os corpos-de-prova do material RX foram mantidos em incubadora a 37°C por 10 minutos.

Imediatamente após a presa, os espécimes foram removidos da matriz e transferidos para uma placa de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), onde cada compartimento continha 1,1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino (MC-SFB). Então, as placas foram colocadas em incubadora a 37°C , onde permaneceram pelos períodos de 24, 48 ou 72 horas (10 espécimes por período). Os corpos-de-prova que permaneceram em contato com o MC-SFB pelos períodos determinados caracterizaram os eluatos utilizados para a análise de citotoxicidade.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos CIVMRs, células da linhagem MDPC-23 foram cultivadas ($30,000 \text{ células/cm}^2$) em placas de acrílico de 24 compartimentos contendo 1 mL de meio de cultura. O meio de cultura completo utilizado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino suplementado com penicilina, estreptomicina e glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). As células foram mantidas por 72 horas em incubadora a 37°C contendo 5% de CO_2 e 95% de ar. Após incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 1 mL do meio contendo os eluatos obtidos dos corpos-de-prova. As placas contendo os eluatos em contato com as células MDPC-23 foram então incubadas por

mais 24h na temperatura de 37°C. Meio de cultura DMEM puro (sem SFB), foi utilizado como grupo controle negativo.

O metabolismo celular foi avaliado através da atividade da desidrogenase succínica, que reflete a respiração mitocondrial. Para este propósito, o teste de MTT foi utilizado. Os procedimentos detalhados deste teste foram anteriormente descritos por Mosmann [26].

Os dados obtidos do teste de MTT foram submetidos a análise estatística de Kruskal-Wallis, complementada pelo teste de Mann-Whitney. Todos os testes foram considerados em um nível de significância de 5%.

2.2. Implante no tecido subcutâneo de ratos.

Cinquenta e quatro tubos de polietileno (10mm de comprimento/1,5mm de diâmetro interno) preenchidos com os materiais experimentais foram implantados no tecido conjuntivo subcutâneo da região dorsal de 27 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus*, Holtzman) pesando entre 230 e 260g. Os animais foram anestesiados com thionembutal (Tiopental – Abbott, 0,1mL para cada 100g de peso do animal) e imobilizados em mesa cirúrgica. Tricotomia foi realizada na região dorsal do animal, sendo que a área foi desinfetada com solução contendo 5% de iodo em 95% de álcool e 5 % de éter em álcool 70%. Pequena incisão central foi realizada e duas lojas cirúrgicas laterais foram cuidadosamente preparadas com profundidade de aproximadamente

18mm. Os tubos de polietileno foram desinfetados com álcool 70%, lavados com água destilada esterilizada, autoclavados e então preenchidos com os materiais experimentais: Grupo 1 – RelyX Luting Cement (RX - 3M ESPE, St Paul, MN, USA); Grupo 2 – Vitremer (VM - 3M ESPE, St Paul, MN, USA); e Grupo 3 – Vitrebond (VB - 3M ESPE, St Paul, MN, USA). VM e VB foram fotoativados (Curing Light XL3000, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) de acordo com as recomendações do fabricante e RX foi mantido não exposto a qualquer tipo de luz, na temperatura de 37°C, durante o período de 10 minutos. A intensidade de luz (410mW/cm²) foi monitorada antes de cada procedimento utilizando-se um radiômetro (Optilux 500, Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA). Sob condições assépticas, os tubos foram imediatamente implantados. Finalmente, as incisões foram suturadas e os animais mantidos em gaiolas separadas com dieta regular e água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados após 7, 30 e 90 dias. Biópsias dos implantes foram realizadas sendo que as peças cirúrgicas foram imersas em solução fixadora de Karnovsky em pH 7,2. Após fixação por 48 horas, os tecidos foram incluídos, à vácuo, em parafina. Cortes seriados com 6µm de espessura foram obtidos, corados com hematoxilina e eosina e avaliados em microscopia de luz (Carl Zeiss, 62744, Oberkächen, Germany). Os materiais experimentais e número de tubos implantados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação entre o número de implantes, materiais experimentais e períodos de avaliação.

Materiais	7 dias	Períodos 30 dias	90 dias
RelyX - G1	6	6	6
Vitremer - G2	6	6	6
Vitrebond - G3	6	6	6
Total	18	18	18
Total de implantes		54	

As seguintes reações teciduais: 1) resposta inflamatória; 2) espessura da cápsula fibrosa adjacente ao material implantado; e 3) presença de macrófagos e células gigantes foram avaliadas. O evento histológico “reação inflamatória” foi classificado como: (1) ausente; (2) discreta; (3) moderada; e (4) intensa, de acordo com o número de células inflamatórias presentes adjacentes ao material experimental. Para medir a resposta inflamatória, cinco regiões foram observadas em cada lâmina. A “espessura da cápsula fibrosa” foi medida para cada grupo experimental utilizando microscópio de luz (Diastar; Cambridge Instruments, Buffalo, NY) adaptado a uma câmera de vídeo (DXC-107A/107P; Sony Electronics, Inc., Tokyo, Japan) e a um microcomputador e software (Mocha, Jandel Scientific, San Rafael, CA). As cápsulas fibrosas com espessura menor que 150 μm foram classificadas como (1) delgadas. Por outro lado, cápsulas fibrosas com mais de 150 μm foram classificadas como (2) espessas. A presença de “macrófagos e células gigantes” foi

classificada como (1) ausente; (2) discreta; e (3) moderada, de acordo com o número destas células específicas adjacentes aos materiais, indicando reação persistente do tecido conjuntivo. Os materiais experimentais foram classificados como biocompatíveis se a intensidade da reação do conjuntivo regredisse com o tempo. Assim, para ser considerado biocompatível, aos 90 dias o tecido conjuntivo adjacente ao material deveria apresentar cápsula fibrosa delgada, bem como ausência de reação inflamatória e/ou células gigantes e macrófagos. Por outro lado, o material não era considerado biocompatível quando reação inflamatória persistente ocorresse, relacionada com a presença de macrófagos e/ou células gigantes e presença de cápsula fibrosa espessa.

3. Resultados

3.1. Ensaio de MTT

Tanto o tempo de permanência dos corpos-de-prova em contato com o meio de cultura quanto as próprias características dos materiais experimentais influenciaram o metabolismo celular, o qual foi representado pela taxa de respiração mitocondrial. Os eluatos obtidos após 24 horas de contato do material com o MC-SFB foram menos citotóxicos do que àqueles obtidos após 48 e 72 horas. VB demonstrou maior citotoxicidade, reduzindo a atividade mitocondrial em 85%; 83%; e 89% após os períodos de 24; 48; e 72 horas, respectivamente. Os efeitos

citotóxicos de VM e RX não foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para o tempo de eluição de 24 horas. Entretanto, VM foi mais citotóxico após 48 e 72 horas ($p < 0,05$). Apesar destes materiais terem sido menos citotóxicos que VB, ambos reduziram o metabolismo celular quando comparados com o grupo controle (DMEM). A figura 1 demonstra a atividade de desidrogenase succínica das células MDPC-23 após 24 horas de contato com os eluatos obtidos após 24, 48 e 72 horas de contato dos corpos-de-prova com o meio de cultura.

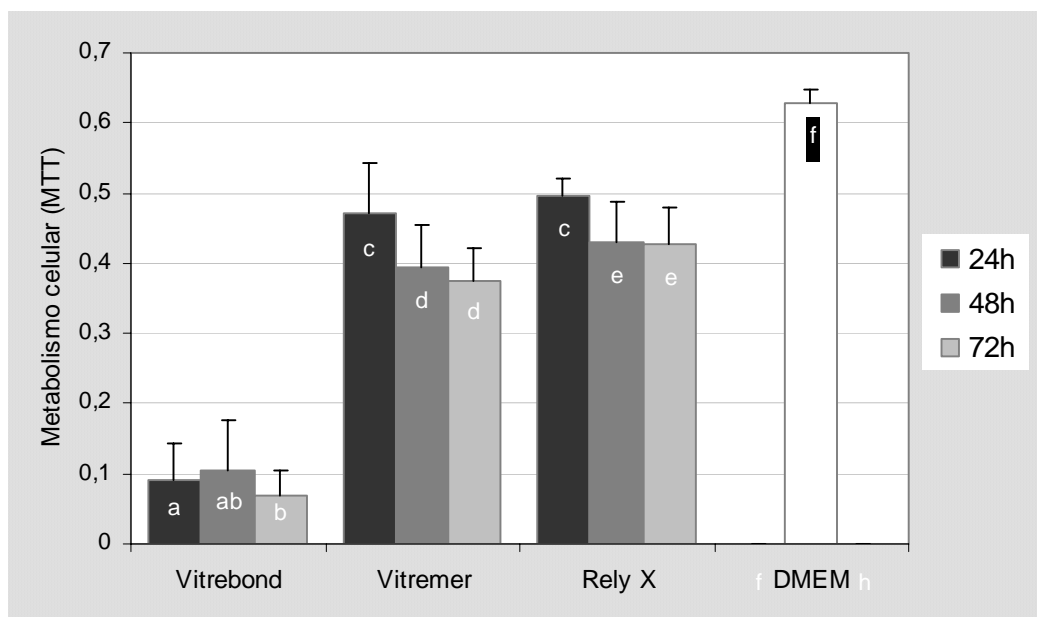


Figura 1: Metabolismo celular para os materiais testados após 24 horas de contato com os eluatos obtidos após 24, 48 e 72 horas. Barras com letras iguais não são estatisticamente diferentes (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

3.2. Implantação no tecido subcutâneo de ratos

A relação entre os períodos de avaliação e a reação do tecido conjuntivo estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Escores determinados para todos os eventos histológicos encontrados de acordo com os grupos experimentais e períodos de avaliação..

	7 dias	7 dias	7 dias	30 dias	30 dias	30 dias	90 dias	90 dias	90 dias
Reação Inflamatória	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA
Ausente	0	0	0	0	0	0	3	3	3
Discreta	0	1	2	3	4	3	2	3	2
Moderada	5	4	3	3	2	3	1	0	1
Intensa	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Cápsula Fibrosa	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA
Delgada	0	0	0	2	3	3	5	5	4
Espessa	6	6	6	4	3	3	1	1	2
Macrófagos/ Células Gigantes	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA	Grupo 1 NA	Grupo 2 NA	Grupo 3 NA
Ausente	0	0	0	1	2	1	5	5	4
Discreta	4	5	5	4	4	4	1	1	2
Moderada	2	1	1	1	0	1	0	0	0

NA – Número de amostras.

7dias: Eventos histológicos semelhantes para a presença de macrófagos e espessura da cápsula fibrosa foram observados para todos os grupos experimentais. A maioria dos espécimes apresentaram cápsula fibrosa espessa adjacente à abertura do tubo. Nestes espécimes, moderada presença de macrófagos adjacente aos materiais implantados foi observada. Entretanto, nos grupos 1, 2 e 3 ocorreu reação inflamatória moderada em 5, 4 e 3 espécimes, respectivamente. A resposta inflamatória mediada por células mononucleares foi também caracterizada

pela presença de vasos sanguíneos dilatados e congestos, edema local e áreas de degradação de colágeno. Apenas um espécime de cada grupo experimental exibiu resposta inflamatória severa.

30 dias: Para os grupos 1, 2 e 3, resposta inflamatória moderada foi observada em 3, 4 e 3 espécimes, respectivamente. A maioria destes espécimes exibia cápsula fibrosa delgada, com poucos macrófagos adjacentes ao local do implante. Naqueles espécimes em que ocorreu resposta inflamatória moderada persistente mediada por células mononucleares, cápsula fibrosa espessa foi observada. Apenas 1 espécime dos grupos 1 e 3 exibiram presença moderada de macrófagos adjacentes aos materiais implantados.

90 dias: Reparo tecidual foi observado para todos os grupos experimentais. Entretanto, reparação completa ocorreu apenas em 3 espécimes de cada grupo, nos quais foi observada cápsula fibrosa delgada e ausência de reação inflamatória. No grupo 3, dois espécimes apresentaram cápsula fibrosa espessa adjacente ao material implantado. Nestes espécimes, uma presença discreta de macrófagos foi observada.

Apesar da reação no grupo 3 ter sido maior que nos grupos 1 e 2, a análise estatística de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Mann-Whitney não demonstrou diferença entre os grupos experimentais para os parâmetros analisados. De acordo com os períodos de avaliação,

diferença estatisticamente significativa foi observada apenas entre 7 e 90 dias do período pós-operatório para todos os grupos experimentais. No grupo 1, diferença significativa quanto à presença de macrófagos e células gigantes também foi observada.

Os gráficos de barra representativos dos eventos histológicos de acordo com os períodos de avaliação estão demonstrados nas figuras 2, 3 e 4.

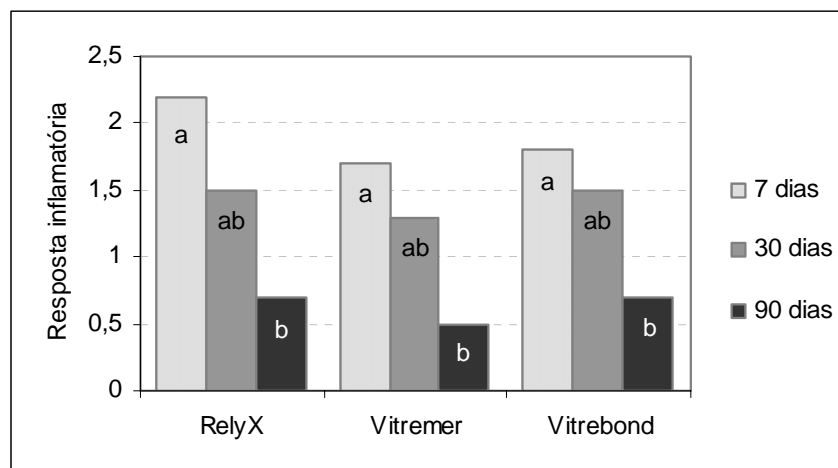


Figura 2: Avaliação comparativa da resposta inflamatória de acordo com os períodos de avaliação.

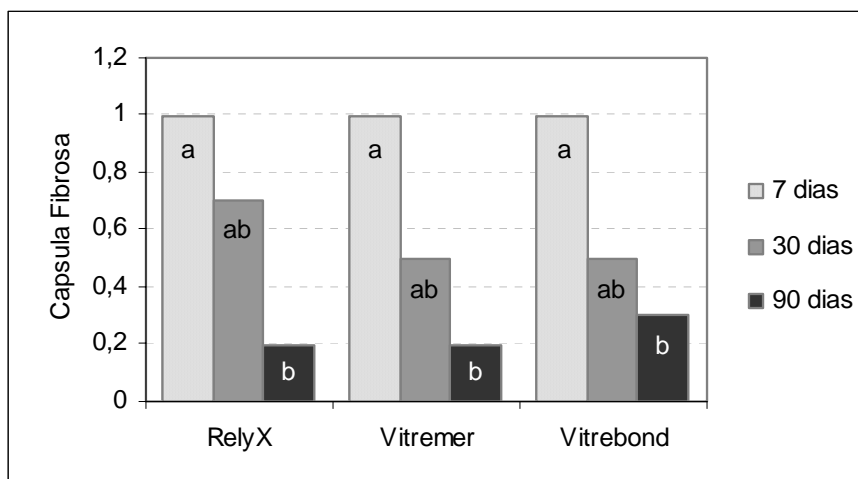


Figura 3: Avaliação comparativa da formação de cápsula fibrosa de acordo com os períodos de avaliação.

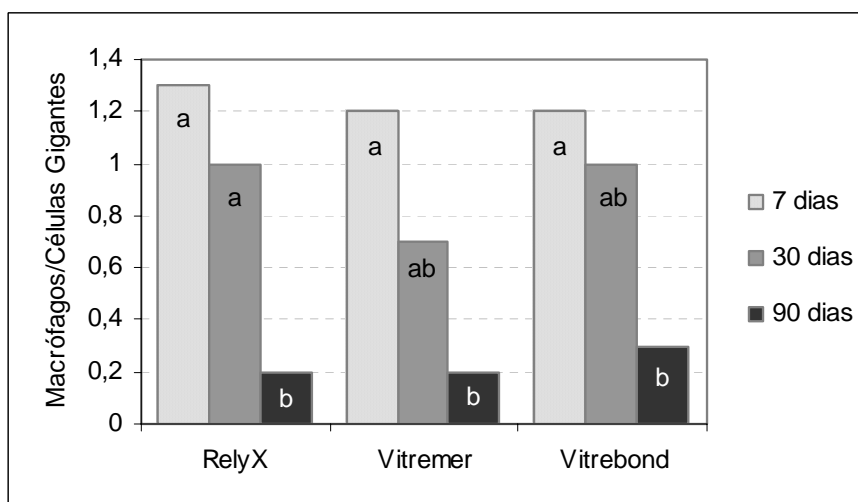


Figura 4: Avaliação comparativa da presença de macrófagos e/ou células gigantes de acordo com os períodos de avaliação.

4. Discussão

De acordo com a ANSI/ADA, os experimentos de citotoxicidade em cultura de células são testes iniciais recomendados para avaliação do efeito citopático causado por materiais experimentais ou seus extratos sobre células em cultura [27]. No presente estudo, CIVMRs utilizados para diferentes aplicações clínicas foram investigados. Todos estes materiais são indicados para aplicação sobre o substrato dentinário, que é composto de aproximadamente 50% de mineral, 30% de matriz orgânica e 20% de fluido dentinário [28]. Este fluido presente na dentina tubular pode solubilizar os componentes dos CIVMRs [8]. Conseqüentemente, compostos químicos liberados no local de aplicação do material, tal como na dentina, podem se difundir através dos túbulos dentinários para alcançar o tecido pulpar, desencadeando resposta inflamatória. Revestindo internamente a dentina existe a camada de odontoblastos, a qual representa o primeiro grupo de células a entrar em contato com os componentes liberados dos materiais capazes de se difundir através deste substrato tubular. Desta forma, parece plausível avaliar o efeito citotóxico de materiais dentários e seus componentes em uma cultura celular que expresse as marcas bioquímicas do fenótipo odontoblástico. Conseqüentemente, no primeiro experimento desta investigação, componentes de três CIVMRs contemporâneos liberados em ambiente úmido (meio de cultura) foram avaliados através de sua aplicação sobre a linhagem de células odontoblastóides imortalizada MDPC-23, as quais

sintetizam o RNAm que codifica para sialofosfoproteína da dentina, uma marca fenotípica dos odontoblastos e seus produtos protéicos [29]. Esta linhagem celular tem sido utilizada na investigação *in vitro* dos mecanismos moleculares de fatores de crescimento [29], efeitos de produtos bacterianos em sua expressão gênica [31], bem como na avaliação da citotoxicidade de materiais dentários e soluções de lavagem de tecido pulpar exposto [32, 33].

Com a finalidade de avaliar a reação do tecido conjuntivo aos CIVMRs experimentais e comparar estes resultados com àqueles obtidos a partir do estudo *in vitro*, a implantação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos foi realizada. Esta metodologia de implantação é um dos testes secundários mais recomendados para avaliação das propriedades de biocompatibilidade dos materiais restauradores e endodônticos [30]. Esta prática padrão para avaliação de biomateriais tem sido empregada por muitos pesquisadores [34, 35, 36].

Acerca do estudo *in vitro*, o ensaio de MTT demonstrou que o VB foi, dentre os materiais avaliados, aquele que apresentou maior citotoxicidade. Esta alta citotoxicidade está de acordo com outros trabalhos existentes na literatura utilizando diferentes linhagens celulares [6, 17]. Palmer et al. [37] analisou a porcentagem de liberação de HEMA por diferentes CIVMRs. Os autores demonstraram que o VB apresentou a maior porcentagem de liberação de HEMA após imersão em água destilada, mesmo quando o material foi fotoativado seguindo as

recomendações do fabricante. Por outro lado, VM apresentou menor valor de liberação de HEMA quando comparado ao VB. Na presente pesquisa, a maior citotoxicidade apresentada pelo VB pode ser explicada pelo fato de que os CIVMRs para forramento/base, tal como VB, contém maiores concentrações de HEMA em sua composição quando comparados com CIVMRs restauradores, tal como VM, devido a uma maior proporção pó:líquido (Tabela 1) apresentada pelos CIVMRs restauradores. Isto se deve ao fato de que para se obter um cimento com viscosidade adequada para aplicação no assoalho cavitário, os agentes forradores são preparados com maior incorporação de líquido, o qual contém o HEMA. Assim, HEMA parece ser o principal componente liberado pela maioria dos CIVMRs responsável por causar intensos efeitos citotóxicos, desde que diversos estudos *in vitro* vêm demonstrando sua citotoxicidade sobre células em cultura [19, 20, 38]. Monômeros de metacrilatos como HEMA são incorporados na bicamada lipídica das células, a qual passa a ser solubilizada pelos monômeros residuais [39]. Desta maneira, pode-se sugerir que o mecanismo de ação dos monômeros sobre as membranas celulares deva ser o principal fator responsável pela alta citotoxicidade do VB, o qual ainda libera produtos de decomposição do iniciador, tal como cloreto de difenil-iodínio, o qual tem sido apontado como um importante agente tóxico para as células em cultura [40]. Apesar da concentração de HEMA no material proporcionado segundo as recomendações do fabricante ser próxima para o VB e RX, este último material causou menor

efeito citotóxico quando comparado ao próprio VB e VM, sendo esta diferença estatisticamente significativa para os períodos de incubação de 48 e 72 horas. Apesar do fabricante não recomendar a fotoativação do RX, o que poderia fazer com que no final da reação houvesse mais monômeros livres, existe a incorporação do composto químico persulfato de potássio em sua formulação. Este composto é responsável pela conversão de monômeros em polímeros [41]. Logo, podemos especular que uma menor quantidade de HEMA tenha se solubilizado quando as amostras de RX foram imersas em meio de cultura. Como o principal componente responsável pela citotoxicidade dos CIVMRs são os monômeros de metacrilatos, sugerimos que a adição do persulfato de potássio ao pó do RX pode ter reduzido a concentração de HEMA livre, levando este material a apresentar-se como o menos citotóxico avaliado na presente pesquisa.

Nos grupos RX e VM, o metabolismo celular diminuiu entre os períodos de 24 e 48 horas. A diferença entre estes materiais foi estatisticamente significativa. Apesar de não ter sido realizada análise quantitativa ou qualitativa dos componentes liberados, a maior citotoxicidade pode ser atribuída a uma contínua liberação de componentes de ambos materiais até o período de 48 horas. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os eluatos obtidos após 48 e 72 horas, sugerindo que o principal período de liberação de componentes tóxicos dos CIVMRs RX e VM ocorre até 48 horas após a manipulação.

Apesar das diferenças observadas entre os materiais *in vitro*, não existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se avaliou a biocompatibilidade *in vivo*. Como demonstrado em estudos prévios [34], a reação inflamatória observada aos 7 dias após o procedimento operatório é parcialmente causada pelo trauma cirúrgico da implantação. O baixo pH prolongado dos CIVMRs também pode ter causado efeito irritante imediato. Entretanto, o edema persistente adjacente à abertura do tubo pode neutralizar os efeitos tóxicos causados pelo pH sobre o tecido conjuntivo. Por outro lado, o ambiente úmido interfere na completa reação de presa dos CIVMRs e participa diretamente na solubilização contínua dos materiais dentários, mesmo após a reação de presa ter sido completada [19]. Desta forma, muitos dos componentes tóxicos, como HEMA, podem ser liberados e se difundirem para locais distantes do sítio de implantação. Conseqüentemente, a reação inflamatória intensa-moderada observada na avaliação de curto prazo (7 dias) pode ter sido causada por diferentes fatores irritantes. Com o tempo, a intensidade e área da reação inflamatória reduziram. Todavia, algumas amostras exibiam a persistência de macrófagos e algumas células gigantes adjacentes à abertura do tubo. Estudos prévios realizados *in vivo* demonstraram componentes resinosos dispersos no tecido conjuntivo aos 30 após implantação de materiais resinosos no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos [34]. Achados histológicos similares foram encontrados na presente investigação, sugerindo que componentes

liberados dos CIVMRs no meio úmido aos 7 dias induziram a uma resposta inflamatória local. Contudo, parte dos componentes liberados, principalmente aqueles de baixo peso molecular, como HEMA, podem ter sido removidos do local via drenagem linfática. Desta forma, no último período de avaliação (90 dias), a reparação local foi obtida para todos os grupos experimentais. Apenas uma amostra dos grupos 1 (RX) e 3 (VB) apresentaram resposta inflamatória moderada persistente. Nestas amostras, macrófagos e células gigantes também foram observados fagocitando glóbulos ou fragmentos liberados dos materiais dentários implantados. Conseqüentemente, os componentes maiores liberados próximos à abertura do tubo parecem ter agido como corpos estranhos, causando reação inflamatória moderada persistente, impedindo o reparo completo do tecido conjuntivo, desde que resíduos de materiais resinosos são fagocitados, porém não digeridos por macrófagos e células gigantes [34].

O estudo *in vitro* evidenciou que os componentes dos CIVMRs liberados em ambiente úmido podem ser altamente citotóxicos para as células em cultura. Na presente pesquisa, a citotoxicidade dos CIVMRs sobre as células MDPC-23 aumentou com o tempo de exposição dos corpos-de-prova ao meio de cultura. Ao contrário, no teste de implantação, os componentes liberados dos CIVMRs contribuíram para a notável reação inflamatória inicial ocorrida no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos (7 dias). Contudo, todos os materiais foram

classificados como biocompatíveis após avaliação em períodos mais longos (30 e 90 dias). Deste modo, fica evidente que diferentes metodologias aplicadas para avaliar a biocompatibilidade e citotoxicidade de materiais dentários podem fornecer resultados que, apesar de contraditórios, se complementam para direcionar a compreensão dos mecanismos de ação destes materiais e seus componentes quando aplicados em situações clínicas específicas. Esta controvérsia entre dados obtidos de estudos *in vitro* e *in vivo* realizados para teste de citotoxicidade e biocompatibilidade já foram demonstrados quando os resultados destas investigações foram comparados [42].

5. Conclusão

Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível concluir que diferentes CIVMRs podem causar distintos efeitos tóxicos para as células MDPC-23. De acordo com a metodologia *in vitro* empregada, VB foi o material mais citopático. O tempo de eluição influenciou na citotoxicidade de todos os CIVMRs estudados até o período de 48 horas. De acordo com a metodologia *in vivo*, todos os materiais podem ser classificados como biocompatíveis para o tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Conseqüentemente, os testes *in vitro* isoladamente não podem ser indicativos únicos do efeito biológico de um determinado material. Testes complementares *in vivo* devem ser realizados, como recomendado pela ANSI/ADA, ISO, FDI para avaliar de maneira mais

ampla a biocompatibilidade dos materiais dentários dentro de suas recomendações de aplicação clínica.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP (Proc. 02/12504-9) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 520027/00-00).

Referências bibliográficas

- 1- Mount GJ. Clinical placement of modern glass ionomer cements. Quintessence Int 1993;24:99-107.
- 2- Gao W, Smales RJ. Fluoride release/uptake of conventional and resin-modified glass ionomers, and compomers. J Dent 2001;29:301-6.
- 3- Bullard RH, Leinfelder KF, Russell CM. Effect of coefficient of thermal expansion on microleakage. J Am Dent Assoc 1998;116 871-74.
- 4- Erickson RL, Glasspoole EA. Bonding to tooth structure: a comparison of glass-ionomer and composite-resin systems. J Esth Dent 1994;6:227-44.
- 5- Costa CAS, Giro EM, do Nascimento AB, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-

modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mat* 2003;19:739-746.

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

7- Cho E, Kopel H, White SN. Moisture susceptibility of resin-modified glass-ionomer materials. *Quintessence Int*. 1995;26:351-8.

8- Mount GJ. Glass-ionomer cements: past, present and future. *Op Dent* 1994;19:82-90.

9- Cattani-Lorente MA, Godin C, Meyer JM. Mechanical behavior of glass ionomer cements affected by long-term storage in water. *Dent Mater*. 1994;10:37-44.

10- de Gee AJ, van Duinen RN, Werner A, Davidson CL. Early and long-term wear of conventional and resin-modified glass ionomers. *J Dent Res*. 1996;75:1613-9.

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

12- Ikeda K, Fujishima A, Suzuki M, Inoue M, Sasa R, Miyazaki T. Resin content in cement liquids of resin-modified glass ionomers. *Dent Mater J*. 1999;18:248-58.

13- Kawai K, Takaoka T. Fluoride, hydrogen ion and HEMA release from light-cured GIC restoratives. *Am J Dent*. 2002;15:149-52.

- 14- Wilson AD. Resin-modified glass ionomer cements. *Int J Prosthodont* 1990;3:425-29.
- 15- McCabe JF. Resin-modified glass-ionomers. *Biomaterials*. 1998;19:521-7.
- 16- Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*. 2003;24:3853-8.
- 17- Oliva, A. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials*. 1998;17:1351-6.
- 18- Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod*. 1996;22:244-8.
- 19- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*. 1991;70:1450-5.
- 20- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*. 1995;74:1602-6.
- 21- Gaintantzopoulou MD, Willis GP, Kafrawy AH. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. *Am J Dent*. 1994;7:39-42.
- 22- Felton DA, Cox CF, Odom M, Kanoy BE. Pulpal response to chemically cured and experimental light-cured glass ionomer cavity liners. *J Prosthet Dent*. 1991;65:704-12.

- 23- Tarim B, Hafez AA, Cox CF. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. *Quintessence Int.* 1998;29:535-42.
- 24- Hensten-Pettersen A, Helgeland K. Sensitivity of different human cell line in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res.* 1981;89:102-7.
- 25- Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp therapy with dentin adhesive systems. A review. *Dental Materials* 2000;16:188-197.
- 26- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
- 27- American Dental Association. ANSI/ADA Specification No. 41. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc* 1979;99:637.
- 28- Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997; 25:441-58.
- 29- Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998; 37:233-49.

30- Olson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981;7:355-68.

31- Telles PD, Hanks CT, Machado MA, Nor JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res*. 2003; 82:466-70.

32- Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater* 1999;25:434-41.

33- Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent* 2001;14:25-30.

34- Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of current adhesive resins. *J Endod* 2000;26:512-16.

35- Ward KW, Slobodzian EP, Tiekotter KL, Wood MD. The effect of microgeometry, implant thickness and polyurethane chemistry on the foreign body response to subcutaneous implants. *Biomater* 2002;23:4185-92.

36- Lehle K, Lohn S, Reinerth G, Schubert T, Preuner JG, Dietrich DE, Birnbaum E. Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with subcutaneous implantation of polymers coated with titaniumcarboxonitride in vivo. *Biomater* 2004;25:5457-66.

37- Palmer G, Anstice HM, Pearson GJ. The effect of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent*. 1999;27:303-11.

38- Stanislowski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 1999;48:277-88.

39- Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y, ¹H and ¹³C NMR studies of interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposome as a model system for odontoblast membrane. *J Dent Res* 1988;67:1438-41.

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

41- Anderson LL, Brouwer WM. Initiators for water-based acrylate emulsion polymerizations. *Coating Tech* 1996 68:75.

42- Wennberg A, Mjör IA, Hensten-Pettersen A. Biological evaluation of dental restorative materials: a comparison of different test methods. *J Biomed Mater Res* 1983;17:23-36.

Título: Avaliação do efeito do concentrado de proteínas extraídas da dentina de coelhos sobre a expressão dos genes que codificam para fibronectina e colágeno tipo-1.

Autores:

Pedro Paulo Chaves de Souza, DDS, Universidade Estadual Paulista /
UNESP, Faculdade de Odontologia , Araraquara, Brasil

Cláudio Miguel da Costa Neto, MS, PhD, Universidade de São Paulo /
USP, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, Brasil

*Carlos Alberto de Souza Costa, DDS, MS, PhD, Universidade Estadual
Paulista / UNESP, Faculdade de Odontologia, Araraquara, Brasil

***Autor correspondente:**

Dr. Carlos Alberto de Souza Costa
Universidade Estadual Paulista, Araraquara – Faculdade de Odontologia
Rua Humaitá, 1680, Centro, CEP: 14801-903 / CP:331
Araraquara, São Paulo
Brasil

Fone: (16)33016478

Fax: (16)33016488

e-mail: casouzac@foar.unesp.br

Avaliação do efeito do concentrado de proteínas extraídas da dentina de coelhos sobre a expressão dos genes que codificam para fibronectina e colágeno tipo-1.

Relevância Clínica

A síntese e deposição de dentina reacional sob a parede pulpar de cavidades profundas aumenta a distância entre o estímulo agressor e a polpa, através do aumento de espessura do remanescente dentinário. O estímulo para esta deposição de dentina terciária poderia ser efetuado através da aplicação de moléculas bioativas, capazes de difusão transdentinária, sobre o assoalho da cavidade antes de se proceder a restauração das mesmas.

Resumo

Os odontoblastos possuem um potencial inerente de responder a estímulos agressores secretando matriz de dentina. Esta matriz é constituída por uma fase orgânica (principalmente colágeno tipo-1), uma fase inorgânica e água. Porém, os mecanismos que regulam o processo de estimulação destas células permanece desconhecido. Fortes evidências sugerem que fatores de crescimento presentes na matriz de dentina participam diretamente desta estimulação, como já demonstrado em estudos *in vivo* e *in vitro*. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a influência do extrato de dentina de coelhos solúvel em EDTA

(ESDP) em diferentes concentrações, sobre a expressão dos genes que codificam para colágeno tipo-1 (COL-1) e fibronectina (FN) em células de linhagem odontoblastica. Para isto, células de linhagem MDPC-23 (30.000 células/cm²) foram cultivadas em garrafas plásticas de 25cm² em meio de cultura DMEM completo e incubadas pelo período de 72 horas em atmosfera contendo 5% de CO₂, 95% de ar na temperatura de 37°C. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e substituído por meio de cultura contendo diferentes concentrações de ESDP, obedecendo-se a seguinte divisão de grupos: Grupo 1 - 0µg/ml de ESDP (controle); Grupo 2 - 0,1µg/ml de ESDP; e Grupo 3 - 10µg/ml de ESDP. Essas garrafas foram mantidas por 24 horas em incubadora nas mesmas condições descritas anteriormente. Então, o RNA total foi extraído de maneira padronizada, utilizando TRIzol (Invitrogen) para cada grupo experimental e controle. O cDNA foi sintetizado utilizando-se a enzima Superscript 2 (Invitrogen) e submetido ao ensaio de RT-PCR para determinação da expressão dos genes que codificam para COL-1 e FN. A intensidade das bandas foi comparada entre os grupos experimentais e controle após eletroforese em gel de agarose a 1%. O controle de carregamento utilizado foi o produto de PCR do gene que codifica para GAPDH. Observou-se que no grupo tratado com as proteínas na concentração de 0,1µg/ml houve aumento na expressão dos genes que codificam para as duas proteínas avaliadas sendo que isto não ocorreu no grupo tratado com as proteínas na concentração de 10µg/ml. Conclui-se que as proteínas bioativas têm

efeito sobre a expressão dos genes que codificam para COL-1 e FN, e que este efeito depende da concentração a que as células foram submetidas.

Introdução

Os odontoblastos são células diferenciadas a partir de células mesenquimais provenientes da crista neural craniana, as quais migram para a região dos maxilares e interagem com as células de origem epitelial da região. Através de uma interação epitélio-mesênquima seqüencial mediada por moléculas sinalizadoras, as células mesenquimais indiferenciadas acabam por se transformar em odontoblastos, os quais são células altamente especializadas (Ruch, Lesot & Begüe-Kirn, 1995).

Após diferenciação, a principal função dos odontoblastos é a de secretar matriz extracelular, componentes da dentina e, finalmente, a mineralização desta estrutura (Goldberg & others, 1995; Rabie & Veis, 1995). Durante o desenvolvimento do dente, a dentina secretada até a completa formação da raiz é chamada dentina primária. A partir daí, a dentina fisiologicamente depositada, agora mais lentamente, é chamada dentina secundária. A dentina terciária pode ser definida como uma matriz de dentina depositada em um local específico no interior da câmara pulpar, em resposta a um determinado estímulo externo. Este tipo de dentina pode ser secretada por odontoblastos primários, os quais

sobreviveram a um estímulo de baixa intensidade, sendo estas células então induzidas, em nível molecular, a sintetizar, secretar e depositar uma matriz dentinária tubular, denominada de dentina reacional (Smith & others, 1995). Por outro lado, quando as células pulpares são submetidas a agressões de alta intensidade, suficientes para causar a morte ou induzir a apoptose de odontoblastos primários, uma nova geração de células odontoblastóides (odontoblast-like cells) surge através da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas da polpa. Estas novas células repõem os odontoblastos primários perdidos, passando agora a depositar a dentina reparadora (Tziafas, Smith & Lesot, 2000).

Apesar desta capacidade de reagir a estímulos de origem variada, o completo mecanismo que regula a síntese e secreção da dentina terciária ainda não está completamente elucidado. Diversos estudos têm demonstrado a participação de fatores de crescimento na diferenciação das células mesenquimais em odontoblastos (Ruch, Lesot & Begue-Kirn, 1995; Saito & others, 2004), na síntese de dentina reacional quando utilizados como material de capeamento pulpar em dentes de animais (Smith & others, 1994; Tziafas & others, 1995; Lovschall, Fejerskov & Flyvbjerg, 2001; Six, Lasfargues & Goldberg, 2002) e na regulação da expressão de genes específicos quando administrados sobre células de origem pulpar (Saito & others, 2004; Yokose & others, 2004; He & others, 2004).

O estudo do mecanismo de ação de fatores de crescimento isolados administrados sobre células em cultura vem fornecendo fortes evidências de que eles regulam a atividade dos odontoblastos e células pulpares (Saito & others, 2004; Yokose & others, 2004; He & others, 2004). Porém, na matriz dentinária não existe apenas um, mas cerca de vinte tipos de proteínas não colagenosas, dentre elas fatores de crescimento distintos (Jones & Leaver, 1974), os quais devem atuar em conjunto no processo de reparo (Ruch & others, 1995). Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito de um concentrado de proteínas extraídas da dentina de coelhos (ESDP) sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 (Hanks & others, 1998). O intuito principal foi investigar o efeito deste concentrado de proteínas na expressão dos genes que codificam para colágeno tipo-1 (COL-1 - principal componente da matriz orgânica da dentina) e fibronectina (FN - proteína que participa do processo de diferenciação dos odontoblastos e no reparo pulpar) (Ruch & others, 1995, Yoshida & others, 1997).

Material e Métodos

Células de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 25cm² (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 IU/mL e 100 µg/mL,

respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e na temperatura de 37° C. As células eram subcultivadas a cada 3 dias, sendo que para isto, estas células eram destacadas da base de acrílico da garrafa de 25cm² através da aplicação pelo período de 2 minutos de uma solução de 0,01M de EDTA em PBS. Então, era realizado o repique das células para uma nova garrafa plástica contendo o meio de cultura DMEM, até que se obtivesse o número de células suficiente para a realização do experimento.

Para a realização do experimento de RT-PCR, células MDPC-23 (30.000 células/cm²) foram semeadas em três garrafas plásticas de 25cm² e mantidas em incubadora por 72 horas. Em cada uma das garrafas plásticas, foram adicionadas diferentes concentrações de ESDP, originando os seguintes grupos: Grupo 1- 0µg/mL; Grupo 2 – 0,01µg/mL; e Grupo 3 – 10µg/mL. O RNA extraído após 24 horas de exposição, utilizando-se para isto o TRIzol (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), foi submetido ao ensaio de RT-PCR. Os pares de primers utilizados para avaliação da expressão dos genes que codificam para FN e COL-1 foram determinados a partir das seguintes seqüências de RNAm, disponíveis no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>: **FN**: Primer R- 5' - GCC AAG ATT CAG AGA CCC GG - 3'; PRIMER F- 5'- CTG GGG TCT ACT CCA CCG AA -3'; **COL-1**: PRIMER R: 5' - AAC TTT GCT TCC CAG ATG TCC - 3'; PRIMER F- 5'- TGA GGT CCA GGA GGT CCA – 3'; e **GAPDH**:

PRIMER R- 5' - ATG GTG AAG GTC GGT GTG AA - 3'; PRIMER F- 5'-TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT - 3'. O controle de carregamento utilizado foi o produto de PCR do gene que codifica para GAPDH e a análise da diferença na expressão dos genes que codificam para COL-1 e FN foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, medindo-se a intensidade das bandas.

Resultados

Nas garrafas das quais foi extraído o RNAtotal após 24h de exposição das células às proteínas, foi observado aumento na expressão dos genes que codificam para COL-1 e FN nas células expostas à concentração final de 0,1µg/mL, sendo que não foi observado efeito na expressão dos mesmos nas células expostas às proteínas na concentração de 10µg/mL (Figura 1).

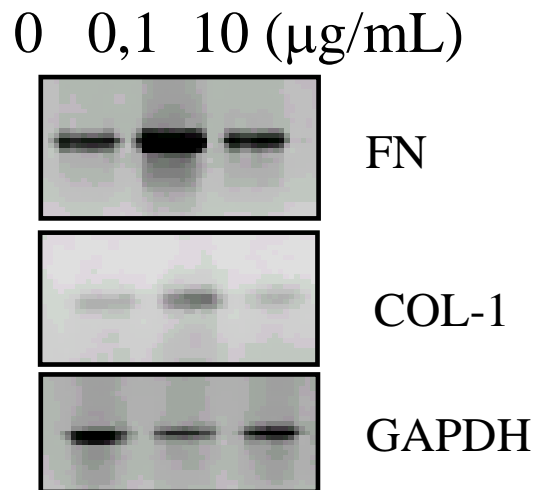


Figura 1: RT-PCR das células MDPC-23 expostas a diferentes concentrações de fatores de crescimento ($\mu\text{g}/\text{ml}$). FN – Fibronectina. Coll(α 1) – colágeno. GAPDH – GAPDH.

Discussão

Uma grande variedade de procedimentos clínicos são utilizados na dentística restauradora com significativo sucesso. Entretanto, muitos tratamentos não visam necessariamente o estímulo e iniciação de eventos teciduais, sendo que nem todos os materiais utilizados atualmente sobre a dentina têm suas propriedades biológicas claramente determinadas (Tziafas, Smith & Lesot, 2000).

Atualmente, existe uma preocupação cada vez maior não só com a restauração do elemento dental em casos de perda de estrutura dentinária, mas também com a biocompatibilidade do material a ser utilizado na substituição da estrutura perdida. Principalmente nos casos em que a cavidade preparada é muito profunda, o clínico deve ser criterioso na escolha do material dentário que será aplicado sobre as

áreas próximas ao tecido pulpar, visto que a resposta deste tecido depende diretamente da espessura de dentina remanescente (Hebling, Giro & Costa, 1999).

Nos casos de cavidades bastante profundas e mesmo nos casos de exposição acidental do tecido pulpar, um grupo de pesquisadores têm direcionado o foco de atenção para o uso de fatores de crescimento como material de capeamento pulpar direto e indireto, visto que os mesmos são não apenas biocompatíveis com o tecido pulpar, mas também induzem a síntese e secreção de dentina reacional (Smith & others, 1994; Smith & others, 1995; Smith & others, 2001) e reparadora (Tziafas & others, 1995; Lovschall & others, 2001; Six & others, 2002).

Como demonstrado por Smith & others (1994), a implantação do mesmo extrato de dentina de coelhos utilizado na presente pesquisa (contendo aproximadamente 115 μ g de TGF- β por sítio de implantação) em cavidades profundas preparadas em dentes caninos de furão, estimulou a secreção de dentina reacional na interface dentina-polpa imediatamente abaixo do assoalho cavitário. O dado obtido da presente pesquisa demonstrou que este concentrado de proteínas provavelmente exerce este efeito aumentando a expressão do gene que codifica para colágeno tipo-1, visto que esta proteína é o principal constituinte da matriz orgânica da dentina, sendo secretada por vesículas que irrompem na predentina (Rabie & Veis, 1995).

Além de ser capaz de estimular a síntese de dentina reacional, o ESDP é capaz de induzir, em casos de exposição pulpar, a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas da polpa em células odontoblastóides. Este fenômeno tem ocorrido quando o ESDP foi aplicado como material de capeamento pulpar direto em dentes de cães, o que resultou na síntese e secreção de dentina reparadora (Tziafas & others, 1995). Sabe-se que o processo fisiológico de diferenciação terminal dos odontoblastos durante o desenvolvimento do elemento dental é dependente da glicoproteína de alto peso molecular denominada fibronectina (Ruch & others, 1995). Tem sido demonstrado também que esta proteína participa do processo de reparo nos casos de exposição pulpar (Yoshida & others, 1996). Um aumento na síntese e secreção da fibronectina é um evento crucial para que, nos casos de perda da camada de odontoblastos primários, haja diferenciação de células pulpares em células odontoblastóides. Portanto, a partir dos dados obtidos na presente pesquisa, pode-se especular que um dos eventos que ocorre no caso do uso de fatores de crescimento extraídos da dentina como material de capeamento pulpar direto é o aumento na síntese e secreção de fibronectina pelas células expostas a estas moléculas, estimulando assim, o processo de cura local.

Não só estudos *in vivo*, mas também estudos *in vitro* têm demonstrado o papel de fatores de crescimento sobre a expressão gênica em odontoblastos e células pulpares (Saito & othes, 2004; Yokose &

others, 2004; He & others, 2004). Os modelo de cultura de células permite uma investigação muito mais aprofundada dos mecanismos de ação dos fatores de crescimento sobre a regulação de genes específicos. Seria impossível demonstrar, por exemplo, que existe uma diminuição na expressão do gene que codifica para sialofosfoproteína da dentina mediada por Smad-3, uma proteína da família das Smads (proteínas recentemente identificadas que são mediadoras intracelulares de TGF- β) quando células de linhagem odontoblástica são expostas a TGF- β 1 em um estudo *in vivo*. Apesar de ser extremamente importante determinar isoladamente o efeito dos fatores de crescimento sobre células pulpare, deve-se ter consciência de que o estímulo para a síntese e secreção de dentina reacional pode ser proveniente de componentes teciduais endógenos liberados da matriz de dentina durante o processo patológico (Smith & others, 1995), sendo que esta matriz dentinária possui em sua composição aproximadamente 20 proteínas não colagenosas distintas (Jones & Leaver, 1974). Desta maneira, este estudo deu início às investigações dos efeitos de um concentrado de fatores de crescimento extraídos da dentina atuando em conjunto sobre células pulpare. Estudos com este extrato total ou com extratos desprovidos de alguns fatores de crescimento podem trazer informações importantes sobre o efeito das moléculas presentes na própria matriz de dentina sobre as células pulpare, para que no futuro, o conhecimento dos mecanismos da dentinogênese possam ser aplicados em variados procedimentos clínicos.

Conclusão

Podemos concluir que os fatores de crescimento extraídos da dentina de coelhos exercem efeito na expressão dos genes que codificam para colágeno tipo-1 e fibronectina e que este efeito é dose-dependente.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP. (Proc. 02/12504-9) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Proc. 520027/00-00).

Referências

Goldberg M, Septier D, Lecolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, Gafni G, Dillouya D, Vermelin L, Thonemann B, Schmalz B, Bissila-Maphou P, Carreau JP (1995) Dental mineralization. The International Journal of Developmental Biology. **39(1)** 93-110

Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT (1998) Cloned 3T6 Cell Line from CD-1 Mouse Fetal Molar Dental Papillae. Connective Tissue Research **00** 1-17

Hebling J, Giro EMA, Costa CAS (1999) Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *Journal of Dentistry* **27(8)** 557-564

He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ (2004) TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Archives in Oral Biology* **49(11)** 911-918

Jones IL, Leaver AG (1974) Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. *Archives in Oral Biology* **19(5)** 371-380

Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A (2001) Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Advances in Dental Research* **15** 108-112

Rabie AM, Veis A (1995) An immunocytochemical study of the routes of secretion of collagen and phosphophoryn from odontoblasts into dentin. *Connective Tissue Research* **31(3)** 197-209.

Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C (1995) Odontoblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology* **39(1)** 51-68.

Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K (2004) Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *Journal of Endodontics* **30(4)** 205-208

Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M (2002) Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Archives in Oral Biology* **47(3)** 177-187

Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne RM, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1994) Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Archives in Oral Biology* **39(1)** 3-22

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* **39(1)** 273-280.

Smith AJ, Tobias RS, Murray PE (2001) Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *Journal of Dentistry* **29(5)** 341-346

Tziafas D (1995) Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *The International Journal of Developmental Biology* **39(1)** 281-290

Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV (1995) Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after *in vivo* implantation of dentine matrix components. *Archives in Oral Biology* **40(10)** 883-893

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* **28(2)** 77-92

Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H (1996) Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *Journal of Dental Research* **75(8)** 1590-1597.

Yokose S, Kadokura H, Tajima N, Hasegawa A, Sakagami H, Fujieda K, Katayama T (2004) Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. *Cell and Tissue Research* **315(3)** 357-384

Considerações Finais

A preocupação dos pesquisadores com a biocompatibilidade dos materiais odontológicos direcionou as pesquisas para a busca de modelos de estudo que pudessem ser utilizados na realização de testes que fossem capazes de determinar a citotoxicidade e a biocompatibilidade dos materiais dentários, bem como avaliar novas propostas de procedimentos clínicos. Há algumas décadas, organizações governamentais ou não vêm tentando padronizar as diversas metodologias de pesquisa recomendadas para avaliar a biocompatibilidade de materiais empregados em diversos procedimentos clínicos. Estes protocolos dividem os testes em uma seqüência que obedece a seguinte ordem: testes iniciais (*in vitro*), testes secundários (*in vivo*, porém fora do sítio de aplicação recomendado pelo fabricante) e testes de aplicação pré-clínica (*in vivo*, utilizados para avaliar o material dentro das recomendações de uso clínico) (COSTA, 2001).

Os testes mais comumente utilizados dentro do grupo dos testes iniciais são os de citotoxicidade em cultura de células (COSTA, 2001). Apesar de não poderem ser extrapolados diretamente para as condições clínicas, os testes de citotoxicidade são relativamente simples, altamente reprodutíveis, rápidos e de custo relativamente baixo, além de evitarem o sacrifício de animais.

Em um estudo de citotoxicidade ideal, os biomateriais deveriam estar em contato com as populações celulares típicas do local

de implantação (OLIVA et al, 1996). No caso de materiais aplicados em contato direto com a dentina, as primeiras células a receberem os estímulos ou a entrarem em contato com os componentes dos materiais utilizados sobre este substrato são os odontoblastos. Logo, pode-se sugerir que a linhagem ideal para os testes de citotoxicidade de materiais dentários seria a de células odontoblastóides.

Por serem células altamente diferenciadas, os odontoblastos não sofrem mitose após a diferenciação terminal *in vivo* (RUCH et al, 1995). Além disto, estas células especializadas se localizam no interior da câmara pulpar juntamente com tipos celulares distintos. Portanto, existe uma grande dificuldade em se isolar uma população clonal de células odontoblastóides que possam sofrer mitose e ao mesmo tempo mantenham suas marcas fenotípicas em cultura. Isolar uma população homogênea de células, mantendo seu fenótipo por um longo período de tempo e demonstrar que estas células estão secretando proteínas exclusivas de odontoblastos ou células odontoblastóides, como a sialofosfoproteína da dentina (DSPP) (BUTLER, 1987) são os passos necessários para a obtenção deste tipo de linhagem, que é uma ferramenta fundamental para se estudar e avaliar a reação deste tipo celular frente a diferentes estímulos (COSTA, 2001).

Buscando um modelo reprodutível, diversos autores estabeleceram linhagens celulares que mantivessem, pelo menos em parte, o fenótipo dos odontoblastos quando mantidas em cultura (KASUGAI et al, 1988,

KAWASE et al, 1990, MACDOUGALL et al, 1995, HANKS et al, 1998). A linhagem RPC-2A, isolada por Kasugai et al (1988), é uma população clonal de células que exibem atividade de fosfatase alcalina, mas não existem evidências de que estas células expressem genes específicos como o que codifica para DSPP. Uma outra linhagem, RDP4-1, também clonada a partir de células provenientes de polpa de ratos, não expressa o gene que codifica para DSPP, assim como para as células RPC-2A (KAWASE et al, 1990). As únicas duas linhagens estabelecidas que expressam este gene são a linhagem MO6-G3 (MACDOUGALL et al, 1995) e MDPC-23 (HANKS et al, 1998), sendo que a segunda foi espontaneamente imortalizada pelo regime 3T6 (subcultivo a cada três dias na concentração de 30.000 células/cm²).

No presente estudo, por ser uma linhagem imortalizada de manipulação relativamente simples, foram utilizadas as células odontoblastoides MDPC-23. Esta denominação corresponde à sigla Mouse Dental Papillae Cell (MDPC), pois tais células foram isoladas a partir de células da papila dental de primeiros molares inferiores de ratos no período de 18 a 19 dias de vida intrauterina. Os diferentes tipos celulares presentes no concentrado de células obtidas a partir da papila dental foram imortalizados e clonados por diluição, sendo que o clone 23 expressava o gene que codifica para DSPP, por isso a denominação MDPC-23. Foi demonstrado também que as células da linhagem MDPC-23 mantêm seu fenótipo até a passagem 77.

Neste trabalho de Dissertação, a linhagem MDPC-23 foi utilizada na investigação dos efeitos citotóxicos das soluções de CLX, dos CIVMRs e do efeito de fatores de crescimento sobre células odontoblastóides em cultura.

O artigo 1, que demonstrou que as soluções de CLX afetam a viabilidade celular de maneira dose-dependente, foi uma importante evidência, mesmo que não possa ser extrapolada para a condição *in vivo*, de que a CLX é citotóxica para as células odontoblastóides. Assim, pode-se especular que tais soluções, se utilizadas diretamente sobre o tecido pulpar ou mesmo em cavidades com pequena espessura de dentina remanescente, podem desencadear respostas pulpares que prejudiquem o processo de reparo. A citotoxicidade das soluções de CLX já havia sido demonstrada em outras linhagens celulares (GOLDSHMIDT et al, 1977, CHANG et al, 2001). O estudo realizado por Chang et al (2001) demonstrou que mesmo concentrações baixas de CLX, tal como 0,0001%, causam efeitos citotóxicos significantes sobre células do ligamento periodontal em cultura. Apesar destes dados estarem evidentes na literatura, não existem informações a respeito do efeito da CLX sobre células pulpares.

É importante que sejam determinados os efeitos das soluções de CLX sobre células pulpares antes que esta solução seja recomendada para os procedimentos clínicos de rotina visto que estudos utilizando diferentes linhagens celulares geralmente apresentam diferentes

resultados (HENSTEN-PETTERSEN & HELGELAND, 1981). Estudos *in vivo* também devem ser realizados avaliando a biocompatibilidade desta solução, pois, como demonstrado no artigo 2, pode haver resultados contraditórios quando um mesmo agente é testado *in vitro* e *in vivo*.

Comparando os dados *in vivo* e *in vitro* obtidos no estudo da biocompatibilidade dos CIVMRs, foi possível observar que o método *in vitro* é muito sensível, detectando diferença entre os grupos provavelmente pela diferente liberação de componentes. Todavia, este tipo de teste não reproduz os eventos que ocorrem no organismo superior, especialmente em relação às reações de longo-prazo. Tem sido sugerido que os componentes de baixo peso molecular liberados dos materiais em contato com o tecido conjuntivo podem ser eliminados do local de implantação via drenagem linfática, enquanto que nos experimentos *in vitro* eles permanecem em contato direto com as células em cultura durante todo o período de exposição das células ao material ou solução experimentais, ocasionando efeito tóxico de notável intensidade.

Ainda em relação ao artigo 2, observou-se que o CIVMR VB, o qual é biocompatível mesmo em cavidades profundas, tais como aquelas que apresentam espessura de dentina remanescente de cerca de 300 μ m (COSTA et al, 2003b), foi o mais citotóxico para as células odontoblastóides da linhagem MDPC-23. Este efeito tóxico do VB parece ser atribuído à liberação de monômeros resinosos que não se

converteram em polímero, tal como HEMA. Todavia, O CIVMR RX também possui HEMA em sua composição, sendo que apesar disto, causou efeito tóxico inferior ao VB. Seria esperado que o RX fosse o material mais citotóxico para as células em cultura, desde que, além de não sofrer fotoativação, este material apresenta maior concentração de HEMA em sua composição em relação ao VB. Todavia, isto não foi confirmado, provavelmente devido à presença do composto químico persulfato de potássio em sua fórmula, o qual é utilizado com o objetivo de reduzir os níveis de monômeros residuais em compostos polimerizáveis (ANDERSON & BROUWER, 1996). O CIVMR VM também se apresentou menos citotóxico que o VB. Este resultado já era esperado, pois além de possuir uma proporção pó-líquido maior (maior quantidade de pó incorporada a uma menor quantidade de líquido, onde exatamente está presente o HEMA diluído em ácidos), estudos prévios demonstraram que a porcentagem de liberação de HEMA pelo VM é inferior àquela determinada para o VB em meio aquoso (PALMER et al, 1999).

Com relação à diferença observada entre as duas metodologias empregadas (citotoxicidade *in vitro* pelo teste de MTT e biocompatibilidade *in vivo* pela implantação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos), o resultado contraditório obtido *in vivo* pode ser atribuído à drenagem linfática, que pode ter eliminado parte dos componentes tóxicos de baixo peso molecular solubilizados e liberados no local da implantação. No último período de avaliação (90 dias) o reparo

no tecido conjuntivo foi observado em todos os grupos experimentais. Apenas uma amostra dos grupos 1 e 3 apresentou resposta inflamatória moderada. Macrófagos e células gigantes também foram observados próximos a glóbulos ou fragmentos maiores liberados dos materiais dentários nestas amostras. A liberação destas partículas pode explicar a reação inflamatória persistente e edema local, desde que células com capacidade de fagocitose parecem não apresentar capacidade de digerir o material disperso em meio ao tecido conjuntivo. Apesar desta diferença nos resultados, ambos experimentos nos trazem informações importantes sobre os materiais em teste.

Os dados científicos obtidos do artigo 2 permitiram concluir que os CIVMRs são biologicamente aceitáveis, apesar de causarem danos celulares. Desta maneira, estes materiais ionoméricos não deveriam ser recomendados para aplicação direta sobre o tecido conjuntivo. Todavia, pesquisas em dentes de seres humanos onde o VB foi aplicado diretamente sobre a dentina não resultou em danos pulpares, determinando a possibilidade de aplicação deste material em condições clínicas específicas, particularmente em situações em que há presença de remanescente dentinário entre o assoalho da cavidade e a polpa. Um material ideal para aplicação sobre o tecido conjuntivo seria aquele que, além de ser biocompatível, não causasse danos celulares e ainda estimulasse a reparação tecidual. O artigo 3 trata do efeito das proteínas bioativas, as quais são moléculas que podem, no futuro, preencher estes

requisitos, sobre as células de linhagem odontoblástica MDPC-23. As terapias utilizadas na regeneração pulpar podem ser aperfeiçoadas com o uso de fatores de crescimento, visto que o efeito dos mesmos sobre células pulpares já é bem documentado (SMITH et al, 1994, TZIAFAS et al, 1995, HU et al, 1998, LOVSCHALL et al, 2001, SMITH et al, 2001, SIX et al, 2002, IOHARA et al, 2004, SAITO et al, 2004, YOKOSE et al, 2004, HE et al, 2004) Tais estudos apresentam evidências de que estas moléculas podem estimular a síntese e secreção de proteínas constituintes da matriz de dentina *in vitro* e *in vivo*.

Na presente pesquisa, os resultados obtidos a partir da exposição das células da linhagem MDPC-23 a fatores de crescimento extraídos da dentina de coelhos (ESDP) permitiram concluir que o efeito deste extrato é dose-dependente. Desta maneira, optou-se pela investigação deste extrato total devido à presença de múltiplos fatores de crescimento em sua composição. Os estudos realizados *in vitro* avaliando o efeito de fatores de crescimento sobre células pulpares utilizam fatores de crescimento isolados (IOHARA et al, 2004, SAITO et al, 2004, YOKOSE et al, 2004, HE et al, 2004). Apesar da resposta obtida ser mais específica quando se utiliza fatores de crescimento isolados, a interação entre os efeitos dos fatores de crescimento presentes na dentina podem nos fornecer dados que reproduzam de forma mais precisa o mecanismo da dentinogênese reacional.

Assim, os artigos apresentados nesta dissertação nos levam a concluir que as soluções de CLX podem apresentar efeitos tóxicos de diferentes intensidades sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23, dependendo da concentração da solução. Também foi demonstrado que os CIVMRs avaliados no presente trabalho podem causar efeitos citotóxicos específicos sobre esta linhagem celular. De acordo com a metodologia *in vitro* empregada no artigo 2, Vitebond foi o material mais citopático. O tempo de permanência dos corpos-de-prova em contato com o meio de cultura influenciou a citotoxicidade de todos os materiais até o período de 48 horas. De acordo com o estudo *in vivo*, todos os CIVMRs estudados puderam ser considerados biocompatíveis ao tecido conjuntivo de ratos. Assim, os testes *in vitro* não podem ser utilizados como única forma de se avaliar o efeito biológico de materiais dentários, porém podem fornecer informações importantes que não são observadas a partir de pesquisas *in vivo*. Finalmente, o artigo 3 permitiu concluir de que o ESDP têm efeito na expressão dos genes que codificam para colágeno tipo-1 e fibronectina, e podem ser, no futuro, utilizados na terapia pulpar vital.

Referências *

ANDERSON, L.L., BROUWER, W.M. Initiators for water-based acrylate emulsion polymerizations. **Coating Tech.**, v.68, n.855, p.75-79 Apr. 1996.

BARATIERI, L.N., et al. Colagem de fragmento dental. In: _____.
Estética: restaurações adesivas em dentes anteriores fraturados. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1995. cap. 6, p. 137-205.

BASRANI, B., SANTOS, J.M., TJADERHANE, L., GRAD, H., GORDUYSUS, O., HUANG, J., LAWRENCE, H.P., FRIEDMAN, S.
Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** St. Louis, v. 94, n. 2, p. 240-245. Aug. 2002

BERG, J.H. Glass ionomer cements. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v. 24, n. 5, p. 430-438. Sept-Oct. 2002.

BOSTON, D.W., LIAO, J. Staining of non-cariou human coronal dentin by caries dyes. **Oper Dent.**, Seattle, v. 29, n. 3, p.280-286. May-Jun. 2004.

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

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

BRÄNNSTRÖM, M. The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. **J. Endod.**, Chicago, v. 12, n.10, p. 475-481, Oct. 1986.

BUTLER WT. DENTIN-SPECIFIC PROTEINS. **Methods Enzymol.**, New York, v.145, p. 290-303. 1987.

BUTLER, W.T., MIKULSKI, A., URIST, M.R., BRIDGES, G., UYENO, S. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 56, n. 3, p. 228-232, Mar. 1977.

CASTRO F.L., DE ANDRADE M.F., DUARTE JUNIOR S.L., VAZ L.G., AHID F.J. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. **J. Adhes. Dent.**, New Malden., v. 5, n. 2, p. 129-138. Summer. 2003.

CAUFIELD, P.W., NAVIA, J.M., ROGERS, A.M., ALVAREZ, C. Effect of topically-applied solutions of iodine, sodium fluoride, or chlorhexidine on

oral bacteria and caries in rats. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 60, n. 5, p. 927-932. May. 1981.

CHANG, Y.C., HUANG, F.M., TAI, K.W., CHOU, M.Y. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.92, n.4, p.446-450. Oct. 2001.

COSTA, C.A.S. Testes de Citotoxicidade em Cultura de Células. In:_____. Metodologia Científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas,. cap. 9, p.145-160. 2001a.

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

COSTA, C.A.S., GIRO, E.M., DO NASCIMENTO, A.B., TEIXEIRA, H.M., HEBLING, J. Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. **Dent. Mat.**, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 739-746. Dec. 2003a.

COSTA, C.A.S., HEBLING, J., GARCIA-GODOY, F., HANKS, C.T. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. **Biomaterials.**, Oxford, v. 24, n. 21, p. 3853-3858. Sep. 2003b.

COSTA, C.A.S., OLIVEIRA, M.F., GIRO, E.M., HEBLING, J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. **Int Endod J.**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 831-839. Dec. 2003c.

COTTON WR. Bacterial contamination as a factor in healing of pulp exposures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v.38, n.3, p.441-450, Sep. 1974.

CROLL, T.P., NICHOLSON, J.W. Glass ionomer cements in pediatric dentistry: review of the literature. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v. 24, n. 5, p. 423-429. Sept-Oct. 2002.

EMILSON, C.G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. **Scand. J. Dent. Res., Copenhagen**, v. 85, n. 4, p. 255-265. May. 1977.

FINKELMAN, R.D., MOHAN, S., JENNINGS, J.C., TAYLOR, A.K., JEPSEN, S., BAYLINK, D.J. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. **J Bone Miner Res.**, New York. v. 5, n. 7, p. 717-723. Jul. 1990.

FUSAYAMA, T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. **Oper. Dent.**, Seattle, v. 4, n. 2, p. 63-70, Spring. 1979.

GIANTANTZOPOULOU, M.D., WILLIS, G.P., KAFRAWY, A.H. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. **Am. J. Dent.** v. 7, n. 1, p. 39-42. Feb. 1994.

GOLDSCHMIDT, P., COGEN, R., TAUBMAN, S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. **J. Periodontol.**, Chicago. v. 48, n. 4, p.212-215. Apr. 1977.

HANKS CT, SUN ZL, FANG DN, EDWARDS CA, WATAHA JC, RITCHIE HH, BUTLER WT. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connect. Tissue Res.**, New York, v. 37, n. 3-4, p. 233-249. 1998.

HANKS, C.T., STRAWN, S.E., WATAHA, J.C., CRAIG, R.G. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 70, n. 11, p. 1450-1455. Nov. 1991.

HE, W.X., NIU, Z.Y., ZHAO, S.L., JIN, W.L., GAO, J., SMITH, A.J. TGF-beta activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-

regulation of DSPP in an odontoblast cell line. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 49, n. 11, p. 911-918. Nov. 2004.

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

HENSTEN-PETTERSEN, A., HELGELAND, K. Sensitivity of different human cell line in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, n. 1, p. 102-107. Feb. 1981.

HIDALGO, E., DOMINGUEZ, C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicol. In Vitro.**, New York, v. 15 n. 4-5, p. 271-276. Aug-Oct. 2001.

HU, C.C., ZHANG, C., QIAN, Q., TATUM, N.B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. **J. Endod.**, Chicago, v. 24, n. 11, p. 744-751. Nov. 1998.

IOHARA, K., NAKASHIMA, M., ITO, M., ISHIKAWA, M., NAKASIMA, A., AKAMINE, A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with

recombinant human bone morphogenetic protein 2. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 83, n. 8, p. 590-595. Aug. 2004.

JONES, I.L., LEAVER, A.G. Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. **Arch. Oral Biol.**, v. 19, n. 5, p. 371-380. May. 1974.

KASUGAI, S.; ADACHI, M.; OGURA, H. Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of rat incisor. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 887-891. 1988.

KAWAI, T., URIST, M.R. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. **J Dent Res.**, Alexandria, v. 68, n. 6, p. 1069-1074. Jun. 1989.

KAWASE, T.; ORIKASA, M.; SUZUKI, A. A clonal prostaglandin-responsive cell line (RDP 4-1) derived from rat dental pulp. **Bone Miner., Amsterdam**, v. 11, n. 2, p. 163-175. Nov. 1990.

KIDD, E.A.M., JOYSTON-BECHAL, S., BEIGHTON, D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. **Br. Dent. J.**, London, v.174, n.7, p.245-248, Apr. 1993.

LIN, Y.H., MICKEL, A.K., CHOGLE, S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium

hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, Chicago, v. 29, n. 9, p. 565-566. Sep. 2003.

LOVE, R.M., JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, Alexandria, v. 13, n. 2, p. 171-183. 2002.

LOVSCHALL, H., FEJERSKOV, O., FLYVBJERG, A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 15, p. 108-112. Aug. 2001.

MACDOUGALL, M.; THIEMANN, F.; TA, H.; HSU, P.; CHEN, L.S.; SNEAD, M.L. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. **Connec. Tissue. Res.**, New York, v. 33, n. 1-3, p. 97-103. 1995.

MARSHALL, G.W., JR, MARSHALL, S.J., KINNEY, J.H., BALOOCH, M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J. Dent.**, Bristol, v. 25, n. 6, p. 441-458. Nov. 1997.

MATHIS, R.S., FERRACANE, J.L. Properties of a glass-ionomer/resin-composite hybrid material. **Dent Mater.**, Copenhagen, v. 5, n. 5, p. 355-358. Sep. 1989.

NASCIMENTO, A.B., FONTANA, U.F., TEIXEIRA, H.M., COSTA, C.A.S. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. **Am J Dent.**, San Antonio, v. 13, n. 1, p. 28-34, 2000.

OLIVA A, DELLA RAGIONE F, SALERNO A, RICCIO V, TARTARO G, COZZOLINO A, D'AMATO S, PONTONI G, ZAPPIA V. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. **Biomaterials.**, Oxford, v. 17, n. 13, p. 1351-1356. Jul. 1996.

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

RATANASATHIEN, S., WATAHA, J.C., HANKS, C.T., DENNISON, J.B. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 74, n. 9, p. 1602-1606. Sep. 1995.

RUCH, J.V., LESOT, H., BEGUE-KIRN, C. Odontoblast differentiation. **Int J Dev Biol.**, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 51-68. Feb 1995.

SAITO, T., OGAWA, M., HATA, Y., BESSHO, K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, n. 4, p. 205-208. Apr. 2004.

SIX, N., LASFARGUES, J.J., GOLDBERG, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 177-187. Mar. 2002.

SMITH, A.J., CASSIDY, N., PERRY, H., BEGUE-KIRN, C., RUCH, J.V., LESOT, H. Reactionary dentinogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 273-280. Feb. 1995.

SMITH, A.J., TOBIAS, R.S., CASSIDY, N., PLANT, C.G., BROWNE, R.M., BÈGUE-KIRN, C., RUCH, J.V., LESOT, H. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 13-22. Jan. 1994.

SMITH, A.J., TOBIAS, R.S., MURRAY, P.E. Transdental stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. **J. Dent.**, Bristol, v. 29, n. 5, p. 341-346. Jul. 2001.

STANLEY H.R. Toxicity Testing of Dental Materials. Boca Raton, FL, CRC Press; 1985.

TARIM, B., HAFEZ, A.A., COX, C.F. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 29, n. 8, p. 535-542. Aug. 1998.

TELLES PD, HANKS CT, MACHADO MA, NOR JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. **J Dent Res.**, Alexandria, v. 82, n. 6, p. 466-470. Jun. 2003.

TZIAFAS, D.; ALVANOU, A.; PANAGIOTAKOPOULOS, N.; SMITH, A.J.; LESOT, H.; KOMNENOU, A.; RUCH, J.V. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after *in vivo* implantation of dentine matrix components. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 40, n. 10, p. 883-893. Oct. 1995.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science.**, Washington, v. 150, n. 698, p. 893-899. Nov. 1965.

WICHT, M.J., HAAK, R., SCHUTT-GEROWITT, H., KNEIST, S., NOACK, M.J. Suppression of caries-related microorganisms in dentine lesions after short-term chlorhexidine or antibiotic treatment. **Caries Res.** New York, v. 38, n. 5, p. 436-441. Sep-Oct. 2004.

WILSON, A.D. Glass-ionomer cement--origins, development and future. **Clin. Mater.**, London, v. 7, n. 4, p. 275-282. 1991.

YOKOSE, S., KADOKURA, H., TAJIMA, N., HASEGAWA, A., SAKAGAMI, H., FUJIEDA, K., KATAYAMA, T. Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. **Cell. Tissue Res.**, Berlin, v. 315, n. 3, p. 357-384. Mar 2004. Epub Jan 22. 2004.

Resumo

SOUZA,P.P.C. - Utilização de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) em estudos de citotoxicidade e na avaliação do efeito de fatores de crescimento sobre a expressão de genes específicos.

Araraquara, 2005, 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

Este estudo teve como objetivo geral utilizar células da linhagem MDPC-23 em testes de citotoxicidade de materiais e na investigação dos efeitos de proteínas bioativas no estímulo da síntese de componentes da matriz dentinária. Os objetivos específicos foram avaliar o efeito citotóxico de soluções utilizadas na lavagem de paredes cavitárias e de materiais dentários recomendados para aplicação em dentina sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Também foi intuito avaliar o efeito do concentrado de proteínas extraídas da dentina de coelho sobre a expressão de genes específicos. Este trabalho, apresentado na forma de três artigos científicos, utilizou a técnica de MTT para avaliar o efeito citotóxico de soluções de CLX em variadas concentrações sobre as células MDPC-23. Esta técnica foi utilizada também para a investigação do efeito citotóxico de três diferentes cimentos de ionômero de vidro modificados por resina: Vitrebond (VB); Vitremer (VM); e RelyX Luting Cement (RX), associada ao teste de implantação destes materiais resinosos no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. A expressão dos

genes que codificam para colágeno tipo-1 e fibronectina nas células expostas ao concentrado de proteínas extraídas da dentina de coelhos foi avaliada por RT-PCR. Os resultados demonstraram que a CLX é citotóxica às células da linhagem MDPC-23 de maneira dose-dependente. Também foi demonstrado que os cimentos de ionômero de vidro são biocompatíveis ao tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, apesar de apresentarem diferentes graus de citotoxicidade sobre as células odontoblastóides. As proteínas bioativas extraídas da dentina de coelhos apresentaram efeito estimulatório na expressão de genes que codificam para colágeno tipo-1 e fibronectina. Pode-se concluir que as células MDPC-23 são um modelo que pode ser utilizado nos testes de citotoxicidade de materiais bem como em estudos sobre os mecanismos da dentinogênese.

Palavras-chave: odontoblastos, cultura de células, materiais biocompatíveis, dentinogênese.

Abstract

SOUZA, P.P.C. – **Use of an odontoblast cell line (MDPC-23) for tests of cytotoxicity and assessment of the effects of growth factors on expression of specific genes.** Araraquara, 2005, 120p. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

The general aim of this *in vitro* and *in vivo* study was to evaluate the cytotoxicity of rinsing solutions and dental materials as well as to determine the expression of genes related with the dentinogenesis. The specific objectives were to evaluate the cytotoxicity effects of rinsing solutions used to clean cavity walls and dental materials used to restore dental cavities. The effects of EDTA soluble dentin proteins (members of TGF- β superfamily) on specific gene expression was also evaluated. For this purpose three scientific papers were prepared: 1) MTT assay was employed to investigate the cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine to MDPC-23 cells as well as to; 2) to determine the cytotoxicity of three different resin-modified glass-ionomer cements (RMGIC): Vitrebond (VB); Vitremer (VM); and RelyX Luting Cement (VM). The results of this *in vitro* study was compared to the *in vivo* study in which RMGICs were implanted into the connective tissue of rats; 3) Type-1 collagen and fibronectin gene expression on cells exposed to EDTA-soluble dentin proteins was assessed by means of semi-quantitative RT-

PCR. The results demonstrated that chlorhexidine is cytotoxic to MDPC-23 cells in a dose-dependent way. It was also demonstrated that RMGICs are biocompatible following implantation into surgical pockets prepared in the dorsal connective tissue of rats in spite of the different degrees of *in vitro* cytotoxicity presented by these materials to MDPC-23 cells. The stimulatory effects of the bioactive molecules on the expression of the genes that encodes to type-1 collagen and fibronectin was clearly demonstrated. Based on the experimental conditions, it was concluded that MDPC-23 cells are suitable model to be used on cytotoxicity tests of dental materials and rinsing solutions as well as to evaluate the dentinogenesis mechanisms.

Keywords: odontoblasts, cell culture, biocompatible materials, dentinogenesis.