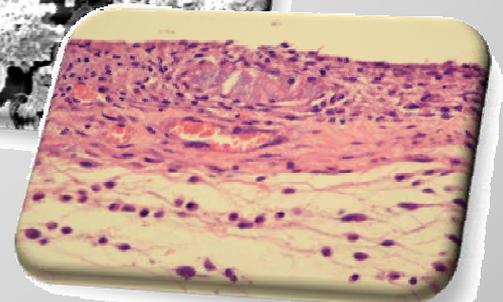
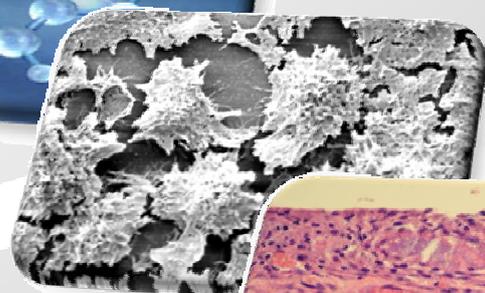
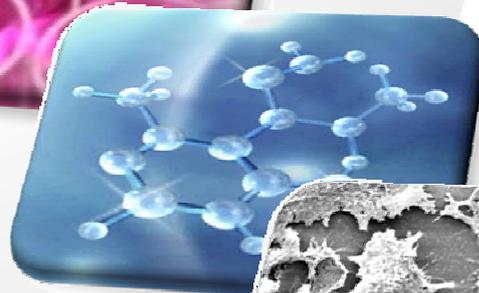


Elisa Maria Aparecida Giro

Análise Química, Citotoxicidade e Biocompatibilidade de Cimentos de Ionômero de Vidro



2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

Elisa Maria Aparecida Giro

**ANÁLISE QUÍMICA, CITOTOXICIDADE E
BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE
VIDRO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para a obtenção do título de Livre-Docente em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria

Araraquara

2009

Giro, Elisa Maria Aparecida

Análise química, citotoxicidade e biocompatibilidade de cimentos de ionômero de vidro / Elisa Maria Aparecida Giro .– Araraquara: [s.n.], 2009.

154 f. ; 30 cm.

Tese (Livre-docência) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

1.Cimentos de ionômeros de vidro 2. Análise química
3.Odontoblastos 4. Materiais biocompatíveis 5. Mediadores da
inflamação 6. Citotoxicidade I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

DADOS CURRICULARES

Elisa Maria Aparecida Giro

Nascimento	4 de setembro de 1962 – Boa Esperança do Sul - SP
Filiação	Anésio Giro Adaide Miné Giro
1981 - 1984	Curso de Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
1986 - 1989	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
1989 - 1992	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
1987 - presente	Professora da Disciplina de Odontopediatria, Departamento de Clínica Infantil, da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho

*Ao meu pai, Anésio (in memoriam),
e à minha mãe, Adaíde,
por todos os sentimentos verdadeiros com os quais me criaram e
educaram,
pelo exemplo de dignidade e de amor em minha vida,
pelo constante apoio, estímulo e pela compreensão para que eu
seguisse sempre firme nos meus ideais.
Amo vocês eternamente.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus,

pelo dom da vida,

pelo seu amor, que me fortalece,

pela sua luz, que guia os meus passos,

por tudo o que me proporcionou na vida,

pelas pessoas que colocou no meu caminho...

Simplesmente por me permitir sentir o seu amor.

Ao meu Anjo da Guarda,

por estar sempre ao meu lado, me protegendo, me

guiando e me dando forças.

A todos os meus familiares,

*pelo carinho, pela atenção e por todos os momentos em que vivemos
intensamente o significado da palavra FAMÍLIA. Que Deus os
abençoe.*

Às primas Ariane e Aline,

*por me darem a oportunidade de vivenciar um pouco as
responsabilidades de uma mãe.*

Adoro vocês.

Aos meus afilhados: Ariane, Clarissa, Dewar e Maria Eduarda,

por me proporcionarem momentos de alegria e de ternura.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos amigos da Disciplina de Odontopediatria - Angela Cristina, Cyneu, Fábio, Josimeri, Lourdes (Tuka) e Rita, pelo carinho e respeito no convívio diário, pelo apoio constante, por tudo que aprendo profissional e pessoalmente com vocês e, principalmente, pela certeza de que muito além de colegas de trabalho, somos unidos por um sentimento maior, a AMIZADE, que faz com que nos preocupemos sempre com o bem-estar uns dos outros. Vocês são uma extensão da minha Família.

À Profa. Dra. Helda Ilka Iost, pela amizade que vai muito além de uma relação orientador - orientando e pela preciosa contribuição para a minha formação profissional. Meu sincero agradecimento.

Aos amigos Josimeri e Carlos Alberto, que se tornaram meus irmãos durante essa caminhada, sempre me apoiando e me ajudando a ultrapassar as barreiras na vida pessoal e profissional. Pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, representada pelo Digníssimo Diretor, **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, e pela Digníssima Vice-Diretora, **Profa. Dra. Andréia Affonso Barretto Montandon**.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento, **Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon**, e pela Vice-Chefe, **Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela **Pofa. Dra. Josimeri Hebling Costa** e pelo **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior**.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, **Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon**, **Dr. Cyneu Aguiar Pansani**, **Dr. Fábio César Braga de Abreu-e-Lima**, **Dra. Josimeri Hebling**, **Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto (Tuka)** e **Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro**, pelo apoio constante e companheirismo e pela harmonia na convivência diária.

Aos professores da Disciplina de Ortodontia, **Dr. Ary dos Santos Pinto**, **Dr. Dirceu Barnabé Raveli**, **Dr. João Roberto Gonçalves**, **Dra. Lídia Parsekian Martins**, **Dr. Luiz Gonzaga Gandini Júnior** e **Dr. Maurício Tatsuei Sakima**, pela atenção, amizade e pelo convívio harmonioso.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, **Antônio Parciaseppe Cabrini (Totó)**, **Cristina Ferreira Afonso**, **Dulce Helena Oliveira**, **Márcia Elena C. dos Santos**, **Odete Amaral**, **Pedro Cesar Alves**, **Sonia Maria Tircailo** e **Tânia Ap. Moreira dos Santos**, que sempre nos dão suporte nas atividades acadêmicas e científicas. Também pela amizade e pela atenção com que sempre atenderam as minhas solicitações. Em especial à **Dona Odete Amaral**, por estar sempre pronta a me auxiliar nos atendimentos clínicos e nas pesquisas realizadas no consultório do Departamento, e à **Sonia Maria Tircailo (Soninha)**, pelo apoio constante, pela amizade e pela eficiência na organização do meu memorial.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, em especial ao **Prof. Dr.**

Carlos Alberto de Souza Costa, pela disponibilização da estrutura física, dos equipamentos e materiais necessários para o desenvolvimento dos experimentos. Principalmente pela realização da análise dos cortes histológicos e valiosa contribuição científica durante a elaboração e a execução deste trabalho. E, também, à técnica de Laboratório, **Juliana Pirola**, pela coloração dos cortes histológicos. Meu especial agradecimento.

Ao Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Óleo não Refinado e Derivados - (CEMPEQC) – Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, coordenado pelo **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira**. Em especial ao **Dr. Alberto Camilo Alcício** e ao doutorando **Danilo Luiz Flumigan**, pelo suporte técnico e auxílio na realização das análises em EDXRF e CG/EM.

Ao Laboratório de Histologia, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela **Profa. Dra. Heleni Balducci Roslindo**. Em especial, ao Técnico de Laboratório **Pedro Sérgio Simões**, pelo processamento das peças e pela realização dos cortes histológicos.

Ao Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela **Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga**, por disponibilizar o equipamento para fotodocumentação dos produtos de PCR amplificados e pelo auxílio.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa/Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária – NAP/MEPA, da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz da Universidade de São Paulo – USP, coordenado pelo **Prof. Dr. Elliot W. Kitajima**, por disponibilizar o microscópio eletrônico de varredura (MEV) para a análise da morfologia celular.

Ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, em especial ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, por disponibilizar o laboratório para a realização das análises de quantificação de íons, e à **Profa. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta** e ao técnico **Sr. Waldomiro Vieira**, pela forma carinhosa com que me receberam e pelo valioso auxílio na execução dos experimentos.

Ao Laboratório de Imunologia Clínica e ao Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, nas pessoas de suas coordenadoras, **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos** e **Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini**, pela utilização do espectrofotômetro para as leituras de

absorbância. Em especial à técnica **Marisa Campos Polesi Placeres** e à pós-graduanda **Fabiana Donofrio**, pelo auxílio na manipulação dos aparelhos.

Às pós-graduandas **Andreza Maria Fábio Aranha**, **Fernanda Campos Rosseti Lessa** e **Indri Nogueira**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, pelo auxílio durante a execução da parte experimental relacionada com a citotoxicidade em cultura de células.

Às pós-graduandas **Nancy Tomoko Sacono**, **Camila Fávero de Oliveira** e **Juliana de Oliveira Gondim**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, pelo auxílio durante a execução da parte experimental relacionada com a biocompatibilidade em subcutâneo de ratos e as análises em RT-PCR.

Ao **Prof. Dr. José Silvio Govone**, do Departamento de Estatística, Matemática Aplicada e Computação do Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro – UNESP, pela orientação na realização das análises estatísticas deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca, **Adriano Ferreira Luiz**, **Eliane Cristina Marques de Mendonça Spera**, **Eliane Maria Sanches Scarso**, **Maria Aparecida Capela Carvalho**, **Maria Helena Matsumoto Komastí Leves**, **Maria Inês Carlos**, **Odete Aparecida Camilo**, **Sílvia Helena Acquarone Lavras**, pela simpatia e ajuda na aquisição dos artigos. Em especial à **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas**, pela revisão da formatação deste trabalho, e à **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli**, pela elaboração da ficha catalográfica.

À **Sra. Maria Lucia Carnesecca Montoro**, pelas correções gramaticais.

A todos os professores, funcionários e aos meus alunos e estagiários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela atenção com que sempre me trataram.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	19
PROPOSIÇÃO.....	23
ESTUDO 1 – “ANÁLISE ELEMENTAR INORGÂNICA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES ORGÂNICOS LIBERADOS POR DIFERENTES CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO”	25
ESTUDO 2 – “CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA”.....	51
ESTUDO 3 – “BIOCOMPATIBILIDADE E INFLUÊNCIA DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO SOBRE A SECREÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS”.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
REFERÊNCIAS.....	144
ANEXO	154

Giro EMA. Análise química, citotoxicidade e biocompatibilidade de cimentos de ionômero de vidro [Tese de Livre-Docência]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

RESUMO

Objetivo: O presente trabalho, dividido em três estudos, teve como objetivo geral identificar e quantificar a liberação de componentes e avaliar a citotoxicidade e a biocompatibilidade de cimentos de ionômero de vidro (CIVs).

Método: Para o estudo 1, extratos dos CIVs Vitrebond (VB), Fuji Lining LC (FL), Vitremer (VM), Fuji II LC (FII), Ketac Fil Plus (KF) e Ketac Molar Easymix (KM) foram obtidos pela imersão de corpos-de-prova em meio de cultura celular (DMEM). Esses extratos (n=9 por grupo) foram analisados por eletrodo específico quanto à presença de flúor e por espectrometria de absorção atômica quanto à presença de alumínio e zinco. HEMA e iodobenzeno foram identificados por CG/EM (n=6). Para o estudo 2, células MDPC-23 foram colocadas em contato com os extratos dos CIVs por 24 horas. Em seguida, foram avaliadas a atividade da desidrogenase succínica (SDH) (n=8), a produção de proteína total (PT) (n=8), a atividade da fosfatase alcalina (FAL) (n=8) e a morfologia celular (n=2). Para o estudo 3, tubos de polietileno (n=24 por grupo) foram preenchidos com os CIVs e implantados no tecido subcutâneo de 42 ratos. Como grupo controle foi utilizada a guta-percha. Após 7 ou 15 dias de pós-operatório, metade dos espécimes de cada grupo e período (n=6) foi preparada para análise histológica, e os demais (n=6) para análise da

expressão de genes que codificam para IL-1 β e TNF- α . **Resultados:** Os extratos de todos os CIVs apresentaram uma concentração de flúor significativamente maior do que o meio de cultura DMEM (controle), tendo o VB liberado maior quantidade, estatisticamente significante, do que os demais CIVs. O VB foi, também, o único material que liberou quantidades relativamente altas de alumínio e de zinco. O HEMA foi identificado nos extratos de todos os CIVs modificados por resina (VB, FL, VM e FII), e o iodobenzeno somente no VB. As porcentagens de atividade da SDH em relação ao grupo controle (DMEM) foram: VB (5,8%), VM (86,7%), FII (90,2%), KM (93,5%), FL (98,9%) e KF (102,5%). A produção de PT não sofreu alterações estatisticamente significativas em relação ao controle quando as células foram mantidas em contato com o extrato do FL. Os extratos dos materiais KF, VM, KM, FII e VB promoveram produção de PT estatisticamente inferior em relação ao controle, cujas porcentagens corresponderam a 81,1%, 70,6%, 64,9%, 55,9% e 10,9%, respectivamente. A atividade da FAL não foi influenciada pelos extratos do FL, VM, FII e KF e reduziu significativamente com KM e VB, correspondendo a 67,1% e 7,7%, respectivamente, em relação ao controle. O VB foi o único material que provocou alterações significativas na morfologia e no número de células. Aos 7 dias não houve diferença estatística na resposta inflamatória para os diferentes CIVs, enquanto, aos 15 dias, o KM apresentou uma reação inflamatória mais intensa do que os demais CIVs, com exceção do VB. Todos os materiais estudados induziram a expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α , e, para o FL, as bandas correspondentes ao TNF- α apresentaram menor intensidade, em comparação aos demais materiais, no período de 15 dias. **Conclusão:** Baseado nas condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que: (1) o VB

foi o material que liberou a maior quantidade de íons (flúor, alumínio e zinco) e de componentes orgânicos (HEMA e iodobenzeno) para o meio de cultura; (2) os CIVs, com exceção do VB, apresentaram efeito citotóxico relativamente baixo sobre as células de linhagem odontoblástica e (3) em geral, os CIVs apresentaram compatibilidade biológica aceitável, embora, para os materiais KM e VB, a reação inflamatória tenha persistido até o período mais longo de análise. Adicionalmente, (4) todos os CIVs induziram a expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α ; porém, aos 15 dias, a intensidade da expressão de TNF- α induzida pelo FL foi menor do que aquela observada para os outros CIVs.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro; análise química; odontoblastos; materiais biocompatíveis; mediadores da inflamação; citotoxicidade.

Giro EMA. Chemical analysis, cytotoxicity and biocompatibility of glass-ionomer cements [Tese de Livre-Docência]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

ABSTRACT

Objective: The aim of this work, divided into three studies, was to identify and quantify released components, and to investigate the cytotoxicity and biocompatibility of glass-ionomer cements (GICs). **Materials and Methods:** For the first study, extracts were obtained by immersion of round-shaped samples of the GICs, Vitrebond (VB), Fuji Lining LC (FL), Vitremer (VM), Fuji II LC (FII), Ketac Fil Plus (KF) and Ketac Molar Easymix (KM) in culture medium (DMEM). The extracts (n=9 *per* group) were analyzed by an ion-selective electrode and atomic absorption to determine fluoride, and aluminum and zinc, respectively. HEMA and iodine benzene were identified into the extracts by GC/MS (n=6). In the second study, MDPC-23 cells were maintained in contact with the extracts of the GICs for 24 hours. Then, succinic dehydrogenase (SDH) activity (n=8), total protein (TP) synthesis (n=8), alkaline phosphatase (ALP) activity (n=8) and cell morphology (n=2) were evaluated. For the third study, polyethylene tubes were filled with the GICs (24 from each material) and implanted into the subcutaneous tissue of 42 rats. Gutapercha was used as control group. After a post-operative period of 7 or 15 days half of the specimens from each group and period (n=6) were prepared for histological analysis, and the other part (n=6) for analysis of the expression of genes that encode for IL-1 β and TNF- α . **Results:** The extracts

of all GICs showed a significantly higher amount of fluoride than the culture medium (DMEM - control group), and VB was the material that released the highest amount of fluoride compared to the other GICs. VB was the only material that released relatively high amounts of aluminum and zinc. HEMA was identified in the extracts of all the resin modified GICs (VB, FL, VM and FII), and iodine benzene only in VB. Percentages of SDH activity related to the control group (DMEM) were: VB (5.8%), VM (86.7%), FII (90.2%), KM (93.5%), FL (98.9%) and KF (102.5%). TP synthesis did not significantly change when cells were maintained in contact with FL extract. KF, VM, KM, FII and VB extracts promoted a TP synthesis significantly lower when compared to the control group and corresponded to 81.1%, 70.6%, 64.9%, 55.9% and 10.9%, respectively. ALP activity was not influenced by FL, VM, FII and KF, but it was significantly reduced by KM and VB, corresponding to 67.1% e 7.7% of the control, respectively. VB was the only material that promoted significant changes in cell morphology and cell number. At 7 days there was not statistically significant differences in inflammatory response among the different GICs, but at 15 days KM specimens showed more intense inflammatory reaction than the others, with exception of VB. All the investigated GICs induced expression of genes that encode for IL-1 β and TNF- α , however at 15 days, the intensity of the expression of TNF- α by FL was lower when compared to the other groups. **Conclusion:** Based on the the experimental conditions of this study it was possible to conclude that: (1) VB was the material that released the highest amounts of ions (fluoride, aluminum and zinc), and organic components (HEMA and iodine benzene) to the culture medium; (2) the GICs, except for VB, showed a relatively low cytotoxic effect on odontoblast-like cells and (3) in general, GICs showed an acceptable

biocompatibility, although KM and VB still presented inflammatory reaction in the longest period of analysis. Additionally, (4) all the GICs induced expression of genes that encode for IL-1 β and TNF- α , though at 15 days, the intensity of the expression of TNF- α induced by FL was lower than that observed for the other GICs.

Keywords: Glass ionomer cements; chemical analysis; odontoblasts; biocompatible materials; inflammation mediators; cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) representam uma categoria de materiais bioativos constituídos por um pó de flúor-alumínio-silicato de vidro e uma solução aquosa de polímeros ácidos, tais como o ácido poliacrílico ou acrílico e copolímeros do ácido itacônico⁶⁷. A sua presa ocorre por meio de uma reação ácido-base entre a solução ácida e os íons liberados das partículas do pó^{45,67}.

O sucesso clínico desse material é atribuído a algumas propriedades, como efeitos cariostático e remineralizador devidos à liberação de flúor^{10,14,21,22,52}, adesão química ao esmalte e à dentina^{9,13,46}, módulo de elasticidade e coeficiente de expansão térmica semelhantes àqueles apresentados pela dentina⁴, microinfiltração reduzida na interface dente/restauração⁴, baixa citotoxicidade^{31,39,41,42,57} e adequada biocompatibilidade^{15,51}. Entretanto, apesar dessas numerosas vantagens, o uso dos CIVs tem sido limitado a cavidades sujeitas a pouco estresse mecânico em decorrência da sua baixa resistência flexural, à tensão diametral, à fratura e ao desgaste^{53,68}.

Assim, a necessidade de melhorar essas propriedades impulsionou o aprimoramento desses materiais, levando ao surgimento dos CIVs modificados por resina⁶⁶. Estes são constituídos por componentes dos CIVs convencionais, aos quais foram adicionados monômeros hidrófilos e iniciadores de polimerização⁶⁶. Nessa categoria de materiais, a presa ocorre, principalmente, por meio da reação ácido-base característica dos CIVs convencionais associada à polimerização dos monômeros resinosos, como ocorre nas resinas

compostas^{36,65,66}. O resultado é uma massa constituída de partículas de vidro envolvidas em uma matriz de polissais e polímeros⁶⁶.

A adição de componentes resinosos resultou em uma melhora nas propriedades físicas e mecânicas desses materiais^{46,68}. Entretanto, pesquisas in vitro têm mostrado que os efeitos citotóxicos da maioria dos CIVs modificados por resina são mais intensos do que aqueles apresentados pelos CIVs convencionais^{7,39,57,61}.

Como os componentes liberados pelos materiais são considerados os responsáveis pelos efeitos adversos às células^{7,30,37-39,42,57,61}, a maior citotoxicidade dos CIVs modificados por resina tem sido atribuída principalmente à liberação de HEMA^{3,24,48,57,61}. Entretanto, outros monômeros, iniciadores e co-iniciadores de polimerização, e produtos da sua decomposição²⁴, assim como o HEMA, podem se incorporar na dupla camada lipídica da membrana celular, provocando a sua solubilização¹⁹, inibir a atividade respiratória mitocondrial³, ou, ainda, promover a depleção da glutathione e a produção de espécies reativas de oxigênio⁵, resultando em morte celular por apoptose.

Como os estudos in vitro mostram que o HEMA pode se difundir através dos túbulos dentinários^{3,23,26,27,40}, seria plausível que os CIVs modificados por resina provocassem intensa resposta inflamatória pulpar in vivo. Entretanto, estudos realizados em dentes de cães²⁰, de macacos^{12,15,47,63} e de humanos^{58,59} têm demonstrado que esses materiais apresentam adequada compatibilidade biológica quando aplicados sobre dentina, que, segundo os autores, é uma importante barreira semipermeável na proteção da polpa, reduzindo a concentração das substâncias que atingem diretamente as células pulpares.

A linhagem celular utilizada nos estudos de citotoxicidade é importante na avaliação dos efeitos citotóxicos dos materiais, uma vez que cada linhagem pode responder de maneira particular ao mesmo material⁴³. Essa, entre outras variáveis experimentais, limita a comparação direta entre os estudos. Embora várias pesquisas tenham investigado a citotoxicidade de CIVs, tanto convencionais como modificados por resina, a maioria foi realizada utilizando diferentes linhagens celulares^{7,8,30,37,39,41,61}, e poucos estudos utilizaram as células de linhagem odontoblástica como células alvo^{1,44,57,60}. Por causa da localização dos odontoblastos revestindo toda a extensão da polpa, essas são as primeiras células a serem desafiadas pelos componentes liberados de materiais que difundem pelo tecido dentinário.

Adicionalmente, poucos são os estudos de biocompatibilidade que fizeram a comparação entre essas duas categorias de CIVs^{15,20}. Ainda, esses estudos utilizaram um número reduzido de materiais, o que faz com que muitos CIVs não tenham sido, até o momento, adequadamente avaliados nos vários níveis de pesquisa recomendados pela ISO³²⁻³⁴.

Além disso, é importante avaliar a resposta do tecido conjuntivo em contato direto com os CIVs, pois, apesar de fornecerem informações importantes, os métodos que utilizam cultura de células apresentam limitações em mostrar o quadro completo de reação tecidual ao material³⁵, o qual envolve o processo inflamatório e a ação do sistema linfático na eliminação do agente agressor.

PROPOSIÇÃO

Geral

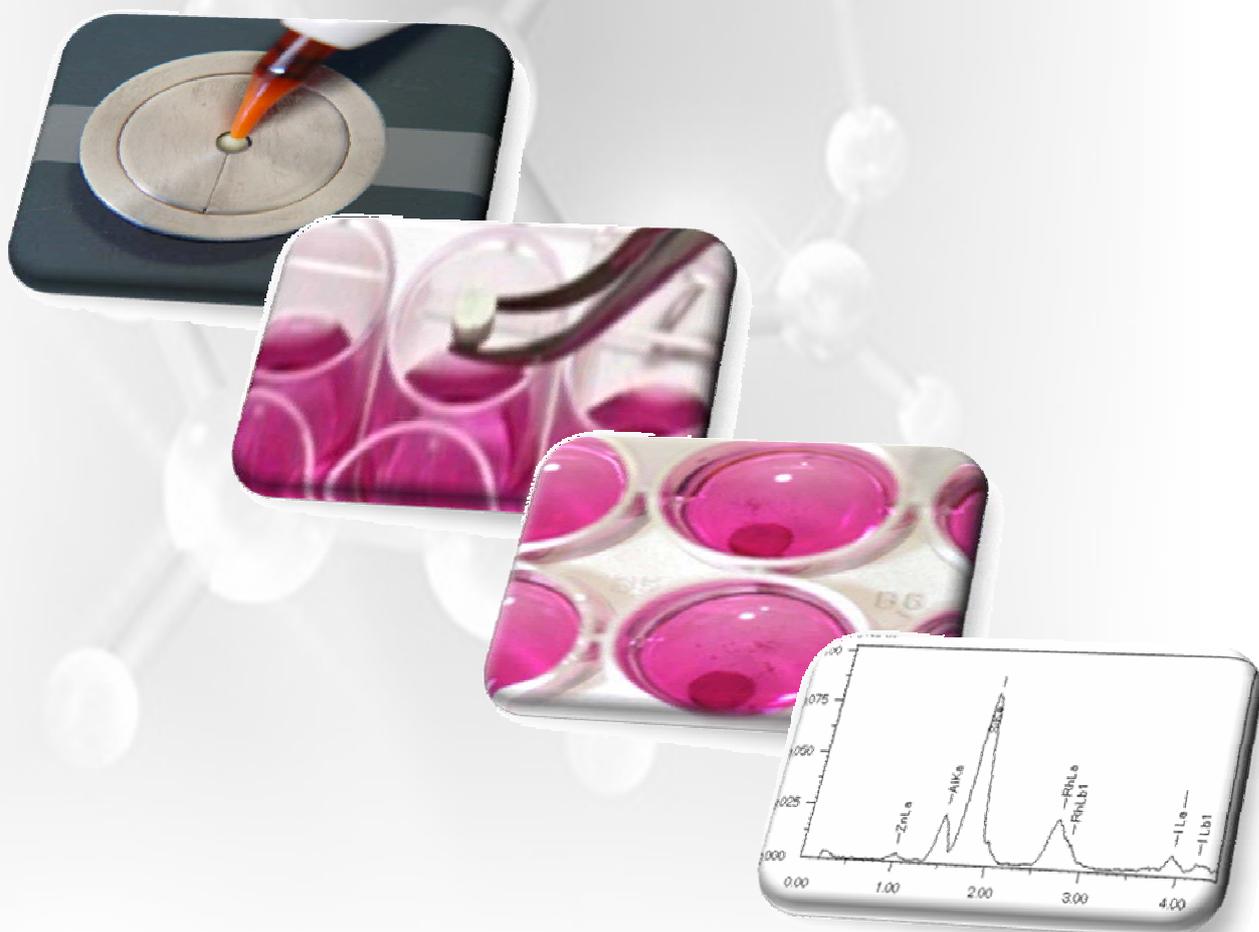
Identificar e quantificar a liberação de componentes e avaliar a citotoxicidade e a compatibilidade biológica de cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina.

Específica

- 1 Analisar a constituição elementar inorgânica de diferentes cimentos de ionômero de vidro e quantificar os íons flúor, alumínio e zinco, bem como identificar os componentes orgânicos, HEMA e iodobenzeno, liberados por esses materiais em meio de cultura celular.
- 2 Avaliar a citotoxicidade de extratos obtidos de cimentos de ionômero de vidro sobre células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) quanto à atividade da enzima desidrogenase succínica, produção de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e morfologia celular.
- 3 Comparar histologicamente a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de diferentes cimentos de ionômero de vidro e avaliar a expressão dos genes que codificam para as citocinas inflamatórias Interleucina 1 ($IL-1\beta$) e Fator de Necrose Tumoral ($TNF-\alpha$).

Estudo 1

Análise Elementar Inorgânica e Identificação de Componentes Orgânicos Liberados por Diferentes Cimentos de Ionômero de Vidro



ANÁLISE ELEMENTAR INORGÂNICA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES ORGÂNICOS LIBERADOS POR DIFERENTES CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO

RESUMO

Objetivos: analisar a constituição elementar inorgânica de diferentes cimentos de ionômero de vidro (CIVs) e quantificar os íons flúor, alumínio e zinco, bem como identificar os componentes orgânicos (HEMA e iodobenzeno) liberados por esses materiais em meio de cultura celular. **Método:** Corpos-de-prova de dois CIVs modificados por resina para base/forramento (Vitrebond e Fuji Lining LC), dois CIVs modificados por resina restauradores (Vitremer e Fuji II LC) e dois CIVs convencionais restauradores (Ketac Fil Plus e Ketac Molar Easymix) foram preparados e analisados por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDXRF) para a determinação quantitativa de elementos inorgânicos (n=3). Em seguida, extratos desses materiais foram obtidos pela imersão de corpos-de-prova em meio de cultura celular por 24 horas (razão superfície total/líquido = 45,7 mm²/mL). Esses extratos foram analisados por eletrodo específico para a quantificação de flúor e por espectrofotometria de absorção atômica para a quantificação de alumínio e zinco (n=9). A identificação do HEMA e do iodobenzeno nos extratos dos materiais foi feita por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) (n=6). **Resultados:** Os elementos inorgânicos identificados em maior porcentagem nos CIVs Vitrebond, Fuji Lining LC, Vitremer, Fuji II LC e Ketac Fil Plus foram estrôncio, silício e alumínio, enquanto o zinco foi detectado apenas no Vitrebond. O Ketac Molar Easymix, apresentou maior porcentagem dos elementos lantânio, cálcio, alumínio e silício.

Os extratos de todos os CIVs apresentaram uma quantidade de flúor significativamente maior do que o controle, tendo o Vitrebond liberado maior quantidade, estatisticamente significativa, do que todos os demais materiais. O Vitrebond foi, também, o único material que liberou quantidades relativamente altas de alumínio e de zinco. O HEMA foi identificado nos extratos de todos os CIVs modificados por resina, e o iodobenzeno, somente no Vitrebond.

Conclusão: O Vitrebond foi o material que liberou a maior quantidade de íons e de componentes orgânicos residuais para o meio de cultura celular. Portanto, entre os CIVs estudados, parece ser aquele que apresenta o maior potencial citotóxico.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro; análise química; flúor; alumínio; zinco; monômeros residuais.

INTRODUÇÃO

Devido à sua propriedade anticariogênica^{8,31}, os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) exercem um importante papel na prevenção da cárie secundária, que constitui a causa mais frequente de substituição de restaurações^{23,28,31,37}. Esses cimentos foram desenvolvidos por Wilson, Kent³⁹ (1972), sendo constituídos pela mistura de um pó de flúor-alumínio-silicato de vidro e uma solução aquosa de polímeros ácidos (ácidos poliacrílico, itacônico e tartárico), e, apesar de apresentarem propriedades de adesão aos tecidos dentários^{7,19,29} e capacidade de liberação e recarregamento com flúor^{8,11,13}, também apresentam desvantagens, como sensibilidade à umidade nos estágios iniciais de presa⁴ e baixa resistência ao desgaste e à fratura^{29,32}, as quais limitam as suas aplicações

clínicas. Com o desenvolvimento desses cimentos, surgiram os CIVs modificados por resina, nos quais houve a incorporação do monômero resinoso 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e de iniciadores de polimerização fotossensíveis³⁸. Estes cimentos apresentam mecanismo de presa dual, consistindo de uma reação ácido-base própria dos CIVs convencionais, a qual ocorre entre os íons liberados das partículas de vidro e o ácido poliacrílico, e de uma polimerização via radicais livres ou fotoquímica semelhante àquela que ocorre nas resinas compostas³⁸.

Esse mecanismo de presa dual tem como vantagem um maior controle da presa do material pelo profissional. Entretanto, associada à rápida polimerização do produto, ocorre uma lenta reação ácido-base, que resulta em prolongado período de liberação de componentes ácidos^{38,40}, o que pode contribuir para uma maior citotoxicidade^{24,34,35}.

Apesar da sua complexidade química, os CIVs modificados por resina são, em geral, capazes de formar ligações mais fortes do que os CIVs convencionais tanto com o esmalte quanto com a dentina^{7,27} e mantiveram a capacidade de liberação e recarregamento com flúor^{9-11,14,18}.

Além do flúor, os CIVs liberam vários outros íons e/ou elementos inorgânicos, como cálcio, sódio, estrôncio, silício e alumínio, sendo o tipo e a quantidade dependentes da composição química do vidro com o qual o pó do material é fabricado e, também, do pH do meio, pois, em condições ácidas, ocorre uma maior liberação^{6,9,18}. Nos CIVs modificados por resina, além da liberação de íons, ocorre também a liberação de monômeros orgânicos e de produtos da decomposição dos fotoiniciadores^{15,35}, os quais constituem um fator

importante que pode influenciar no aumento da citotoxicidade desses materiais^{15,34,35}.

Considerando que os íons, bem como os monômeros orgânicos e os produtos da decomposição dos fotoiniciadores liberados pelos CIVs têm o potencial de causar efeitos deletérios sobre as células pulpares^{34,35}, avaliar a sua liberação em meio de cultura celular, que apresenta um pH neutro, parece ser importante antes de qualquer avaliação dos efeitos citotóxicos apresentados por esses materiais. Assim, este estudo foi realizado com o objetivo de analisar a constituição elementar inorgânica de diferentes CIVs e quantificar os íons flúor, alumínio e zinco, bem como identificar os componentes orgânicos (HEMA e iodobenzeno) liberados por esses materiais em meio de cultura celular.

MATERIAL E MÉTODO

As especificações dos cimentos de ionômero de vidro usados neste estudo estão apresentadas na Tabela 1.

1 Identificação e análise dos elementos inorgânicos presentes nos cimentos de ionômero de vidro

Os materiais foram manipulados em temperatura ambiente ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes, e introduzidos, com o auxílio de seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, Brasil), em matrizes de aço inoxidável medindo 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Sobre a superfície do material, foram colocadas uma tira matriz de poliéster e uma lâmina de vidro de 1 mm de espessura, a qual foi pressionada

contra a matriz com um peso de 500 gf para auxiliar na eliminação dos excessos de material. Para a fotoativação dos CIVs modificados por resina, foi utilizado um aparelho de luz halógena (Optilux 500, Demetron/Kerr Corp., Orange, CA, EUA) posicionado a um milímetro da superfície do corpo-de-prova, diretamente sobre a lâmina de vidro. A intensidade de luz do aparelho fotopolimerizador (470 ± 10 mW/cm²) foi avaliada previamente à confecção dos corpos-de-prova por meio de um radiômetro (Optilux Radiometer, model 100 P/N 10503, Demetron Research Corporation, Danbury, CT, EUA), e o tempo de fotoativação dos CIVs modificados por resina seguiu as recomendações de seus fabricantes específicos (Tabela 1). Os CIVs convencionais permaneceram nas matrizes, sob pressão e luz ambiente, pelo período de 10 minutos para que ocorresse a presa inicial. Em seguida, os corpos-de-prova foram removidos das matrizes e permaneceram em estufa com 100% de umidade a 37°C durante 60 minutos.

Decorrido esse período, os corpos-de-prova foram submetidos à análise por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDXRF), a qual determina quantitativamente os elementos atômicos inorgânicos (em porcentagem) variando de sódio (Na) a urânio (U). Antes da análise, o espectrômetro (EDX800, Shimadzu, Tóquio, Japão) foi calibrado com uma amostra padrão 100% de alumínio. O gerador de raios X com tubo de ródio (Rh) foi operado com uma voltagem de 50 kV, corrente de 20 mA, colimador de 10 mm de diâmetro, sem filtros e com refrigeração a ar. A câmara das amostras foi mantida em atmosfera a vácuo, sendo o detector resfriado a -174°C com nitrogênio líquido. Três corpos-de-prova de cada material foram analisados sob essas condições.

Tabela 1 - Cimentos de ionômero de vidro comercialmente disponíveis usados no estudo

Nome Comercial (Fabricante)	Classificação*/ Indicação	Composição (porcentagem em peso)	Proporção Pó/Líquido	TFR/ TPI**
Vitrebond (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV modificado por resina / forramento-base	Pó: pó de vidro (flúor-alumino-silicato de vidro) > 95%; cloreto de difenil iodo < 2% Líquido: copolímeros dos ácidos acrílico e itaconico - 35%-45%; 2-hidroxietil metacrilato(HEMA)- 20%-30%; água - 30%-40%	1,4:1	30 s
Fuji Lining LC (GC, Tokyo, Japão)	CIV modificado por resina / forramento-base	Pó: alumino-silicato de vidro - 100% Líquido: ácido poliacrílico - 65%-75%; 2-hidroxietil metacrilato - 8%-10%; outros componentes - 5%-15%	1,4: 1	30 s
Vitremer (3M -ESPE Dental Products, St. paul, MN, EUA)	CIV modificado por resina / restauração	Pó: vidro tratado (flúor-alumino-silicato de vidro) - 90%-100%; persulfato de potássio < 1% Líquido: copolímeros dos ácidos acrílico e itaconico - 45%-50%; água - 25%-30%; 2-hidroxietil metacrilato - 15%-20%	2,5:1	40 s
Fuji II LC (GC, Tokyo, japão)	CIV modificado por resina / restauração	Pó: alumino-silicato de vidro - 100% Líquido: ácido poliacrílico - 20%-22%; 2-hidroxietil metacrilato - 35%-40%; outros componentes - 5%-15%; 2,2,4 trimetil hexametileno dicarbonato - 5%-7%; trietileno glicol dimetacrilato - 4%-6%	3,0:1	40 s
Ketac Fil Plus (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV convencional / restauração	Pó: pó de vidro (cristais de flúor-alumino- silicato) ≈ 100% Líquido: água - 60%-65%; ácido polietileno policarbonico - 30%-40%; ácido tartárico - 5%-10%	3,2:1	7 min
Ketac Molar Easymix (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV convencional / restauração	Pó: pó de vidro (cristais de fluor-alumino- silicato) - 85%-95%; ácido poliacrílico - 5%-15% Líquido: água - 55%-65%; ácido polietileno policarbonico - 25%-35%; ácido tartárico - 5%-10%	2,9:1	5 min

* De acordo com McLean et al.²⁶, 1994.

**TFR: tempo de fotoativação recomendado pelo fabricante; TPI: tempo de espera para presa inicial.

2 Quantificação dos íons flúor, alumínio e zinco liberados pelos cimentos de ionômero de vidro em meio de cultura

Para esta finalidade, foram confeccionados nove corpos-de-prova medindo 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (superfície total igual a 50,24 mm²) para cada grupo experimental. Após a polimerização dos CIVs modificados por resina, e decorridos 10 minutos da manipulação dos CIVs convencionais, os corpos-de-prova foram removidos das matrizes e permaneceram em estufa com 100% de umidade a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, cada corpo-de-prova foi imerso em um compartimento de placa esterilizada para cultura de células (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA), contendo 1,1 mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Sigma Chemical CO., St Louis, MO, EUA), sem soro fetal bovino (razão superfície total/líquido igual a 45,7 mm²/mL). Decorrido o tempo de imersão de 24 horas em estufa a 37°C, o meio de cultura contendo os componentes liberados pelos materiais ionoméricos (extrato) foi coletado e usado nas análises para quantificação dos íons flúor, alumínio e zinco.

Para a dosagem do flúor (F), alíquotas dos extratos obtidos dos CIVs foram misturadas com TISAB III (*Total Ionic Strength Adjustment Buffer* - Orion, nº 940911, Orion Research Inc., Boston, MA, EUA), na razão de 1:0,1, para evitar a formação de complexos entre o flúor e outros íons liberados pelos materiais, tais como alumínio, cálcio e, em menor extensão, magnésio. Essa análise foi realizada utilizando um eletrodo específico para íons flúor (Modelo 51928, Hach Company, Loveland, Colorado, EUA), acoplado a um potenciômetro (Analisador de Íons Digital - EA-940, Orion Research Inc., Boston, MA, EUA) previamente calibrado pela leitura em triplicata de uma série de

soluções padrão (0,03125 µg; 0,0625 µg; 0,125 µg; 0,25 µg; 0,50 µg; 1,0 µg; 2,0 µg e 4,0 µg de flúor/mL). Após a calibração e a dosagem de cada 10 amostras, foi realizado o teste de exatidão com um padrão de concentração conhecida (2,0 µg de flúor/mL). Os resultados foram obtidos em milivolts (mV) e transformados em microgramas de flúor por mililitro (µg F/mL).

O alumínio (Al) e o zinco (Zn) foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica, sendo, para o Al, utilizadas chama de óxido nitroso e acetileno e lâmpada catódica num comprimento de onda de 309,3 nm. O espectrofotômetro (Varian - AA 50, Mulgrave, Austrália) foi calibrado com soluções padrão (1,0 µg; 2,5 µg; 5,0 µg; 10,0 µg e 25,0 µg de Al/mL). As amostras não foram submetidas a pré-tratamento, e a sensibilidade limite dessa análise foi considerada 1,0 µg de Al/mL. Para o Zn usou-se chama de acetileno e ar e lâmpada catódica num comprimento de onda de 213,9 nm. O espectrofotômetro foi calibrado com cinco soluções padrão (0,01 µg; 0,05 µg; 0,10 µg; 0,50 µg e 1,0 µg de Zn/mL), sendo a sensibilidade limite dessa análise 0,01 µg de Zn/mL. As amostras foram avaliadas sem pré-tratamento.

Para as análises de Al e Zn, a curva de calibração com as soluções padrão foi repetida a cada dez amostras analisadas, e os resultados foram expressos em µg/mL.

As concentrações de F, Al e Zn foram determinadas (n=9) no meio de cultura puro DMEM (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, EUA) sem suplementação com soro fetal bovino como controle da quantidade já existente no meio.

Como os dados obtidos nessas análises ($\mu\text{g/mL}$) não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para testar a hipótese nula de que não existiam diferenças entre as concentrações de F, Al e Zn liberadas pelos diferentes CIVs para o meio de cultura celular. Quando essa hipótese foi rejeitada, realizou-se a comparação dos grupos dois a dois pelo teste de Mann-Whitney, para identificar as diferenças. Todos os testes estatísticos foram avaliados considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

3 Identificação do monômero orgânico 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e do iodobenzeno (IB) nos extratos obtidos dos cimentos de ionômero de vidro

Para esta finalidade, foram confeccionados seis corpos-de-prova medindo 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (superfície total = $50,24 \text{ mm}^2$) para cada grupo experimental. Cada corpo-de-prova foi imerso em um compartimento contendo 1,1 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino (razão superfície total/líquido = $45,7 \text{ mm}^2/\text{mL}$) e mantido em estufa com 100% de umidade a 37°C por 24 horas para a obtenção dos extratos. Em seguida, os extratos foram analisados por meio de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM) para a identificação do HEMA e do iodobenzeno, liberados dos CIVs para o meio de cultura. O meio de cultura DMEM puro foi usado como controle negativo do experimento.

Para a realização das análises, foi utilizado cromatógrafo gasoso/espectrômetro de massas (GC-17A/QP-5050A, Shimadzu, Tóquio, Japão),

acoplado a um processador automático (AOC20i, Shimadzu, Kyoto, Japão), cuja manipulação foi realizada com o auxílio do *software* GCMS Solutions v. 1.02 Workstation (Shimadzu, Kyoto, Japão). Todas as análises foram obtidas utilizando espectrometria de massa com impacto eletrônico (EI/MS), modo íon positivo, com o modo de aquisição de varredura total (40 m/z a 500 m/z) e energia de ionização igual a 70 eV.

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar de sílica fundida não polar SPB™-1 MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,1 µm de espessura de filme) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA), com dimetilpolisiloxano como fase estacionária e hélio como gás de arraste a um fluxo constante (1 mL min⁻¹). Aliquotas das amostras (1 µL) foram injetadas em modo *split* (1:20) com tempo para eliminação do solvente igual a 3 minutos. As temperaturas do injetor e da interface do detector permaneceram em 260°C e 280°C respectivamente. A temperatura do forno foi mantida inicialmente a 60°C por 2 minutos, e, então, aumentou 2°C/min até atingir 180° C. Finalmente, a temperatura aumentou 10°C/min até atingir 240°C e foi mantida constante por 10 minutos, perfazendo um total de 78 minutos de análise.

A identificação do HEMA e do iodobenzeno foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa dos cromatogramas dos extratos obtidos dos diferentes CIVs com os cromatogramas dos padrões autênticos do HEMA (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) e do iodobenzeno (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), injetados nas mesmas condições. Os resultados dessa análise foram apresentados de forma descritiva.

RESULTADO

1 Identificação e análise dos elementos inorgânicos presentes nos cimentos de inonômero de vidro

A composição quantitativa dos elementos inorgânicos (em porcentagem) dos CIVs Vitrebond (VB), Fuji Lining LC (FL), Vitremer (VM), Fuji II LC (FII), Ketac Fil Plus (KF) e Ketac Molar Easymix (KM), determinada por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDXRF), está apresentada na Tabela 2.

Na Figura 1, os espectros obtidos usando uma energia de 40 keV mostram que todos os CIVs exibiram sinais significativos dos seus principais componentes, com um perfil espectral semelhante entre si, com exceção do Ketac Molar Easymix.

Os elementos inorgânicos identificados em maior porcentagem para os CIVs, Vitrebond, Fuji Lining LC, Vitremer, Fuji II LC e Ketac Fil Plus, foram estrôncio (Sr), silício (Si) e alumínio (Al), enquanto o zinco (Zn) foi detectado em grande quantidade apenas no Vitrebond. Por outro lado, o Ketac Molar Easymix apresentou maior porcentagem de lantânio (La), cálcio (Ca), alumínio (Al) e silício (Si), não sendo detectado estrôncio (Sr) nesse material. Além disso, depois de 24 horas em contato com o meio de cultura DMEM, a composição de elementos inorgânicos analisada nos corpos-de-prova dos CIVs não foi modificada, e apenas uma pequena redução ou pequeno aumento na porcentagem dos elementos principais pode ser observada.

Tabela 2 – Quantificação dos principais elementos atômicos inorgânicos (em porcentagem) identificados nos cimentos de ionômero de vidro pela Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDXRF)

Elemento Inorgânico	Quantificação dos Principais Elementos Inorgânicos (%)* nos Cimentos de Ionômero de Vidro					
	VB	FL	VM	FII	KF	KM
Zn	32,9 (0,4)	0,1 (0,08)	-	-	-	-
Sr	32,8 (0,2)	59,5 (0,5)	52,8 (1,6)	56,8 (1,7)	46,9 (0,3)	-
La	-	-	-	-	7,7 (0,1)	30,8 (2,7)
Si	20,8 (0,4)	23,2 (0,6)	27,5 (0,2)	29,4 (1,1)	24,2 (0,3)	17,2 (0,8)
Al	10,8 (0,1)	12,6 (0,3)	13,8 (0,2)	12,3 (0,4)	14,5 (0,3)	20,0 (0,7)
P	0,7 (0,6)	2,6 (0,04)	2,4 (0,1)	0,9 (0,3)	3,2 (0,09)	2,4 (0,2)
Ca	0,6 (1,0)	0,1 (0,1)	-	0,1 (0,1)	0,2 (0,03)	26,2 (1,5)
Na	-	-	1,6 (0,08)	-	2,6 (0,4)	1,2 (2,0)
Fe	0,6 (1,1)	0,6 (0,09)	0,2 (0,1)	0,2 (0,01)	-	-

*Elementos atômicos inorgânicos detectados por EDXRF variam de sódio (Na) a urânio (U); valores representam a média (desvio padrão) de três corpos-de-prova (n=3).

VB = Vitrebond, FL = Fuji Lining LC, VM = Vitremer, FII = Fuji II LC, KF = Ketac Fil Plus, KM = Ketac Molar Easymix.

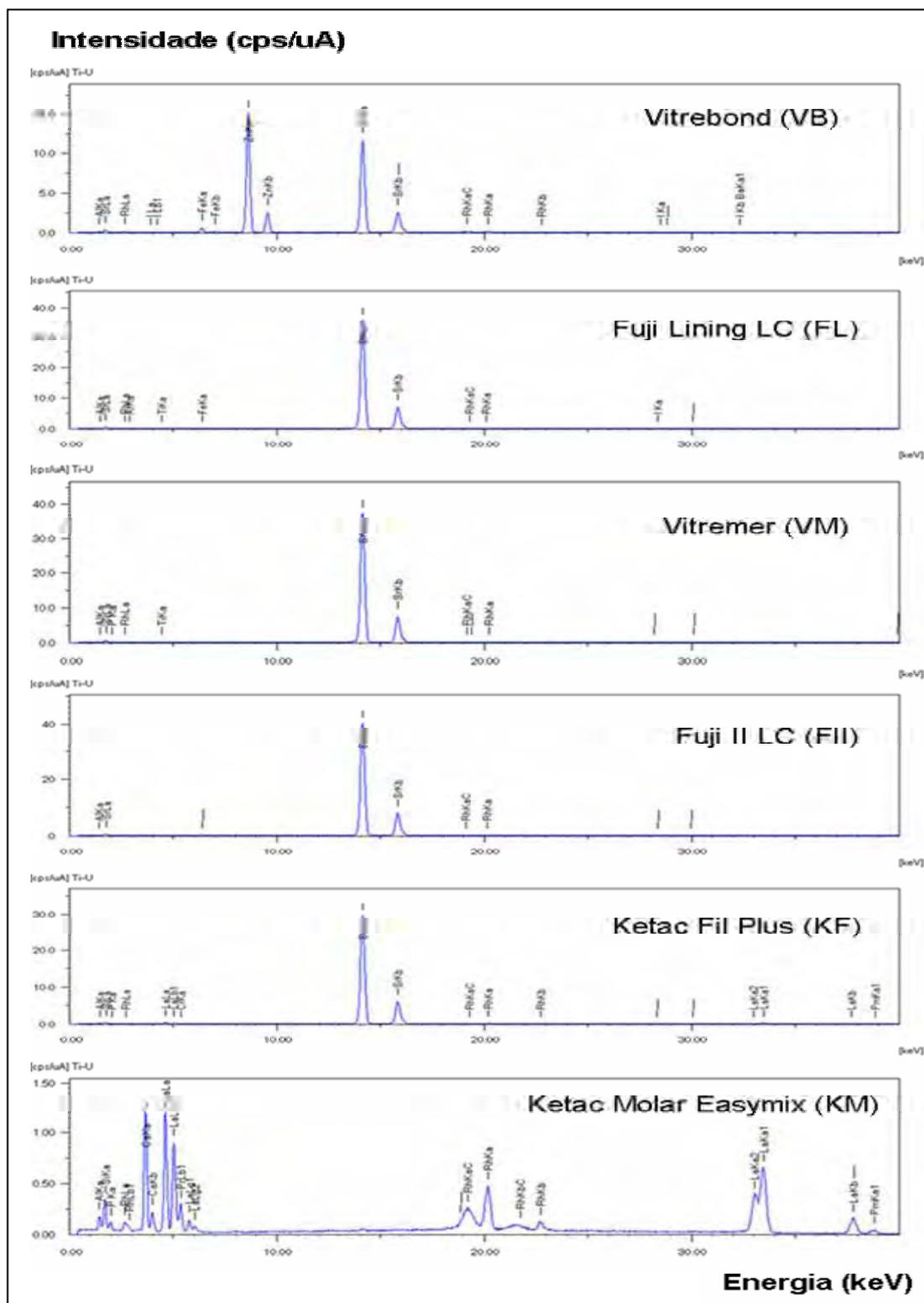


FIGURA 1 – Perfil espectral dos cimentos de ionômero de vidro analisados por Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDXRF).

2 Quantificação dos íons flúor, alumínio e zinco liberados pelos cimentos de ionômero de vidro em meio de cultura

Os resultados da quantificação dos íons flúor, alumínio e zinco estão apresentados na Tabela 3.

Todos os extratos dos materiais ionoméricos analisados neste estudo apresentaram uma quantidade significativamente maior de flúor em comparação com o meio de cultura puro (controle negativo). O Vitrebond liberou quantidade significativamente maior de flúor que os outros materiais ($p < 0,05$), seguido pelo Fuji Lining LC, que também liberou mais flúor que os demais cimentos ($p < 0,05$). Os extratos dos CIVs restauradores convencionais e modificados por resina não apresentaram diferença significativa na concentração de flúor ($p > 0,05$).

O Vitrebond liberou uma quantidade relativamente alta de alumínio para o meio de cultura, enquanto, para os demais materiais, a quantidade de alumínio liberado ficou abaixo do limite de quantificação do método de análise utilizado.

O zinco foi detectado em alta concentração apenas no extrato obtido do Vitrebond. Os extratos dos demais materiais apresentaram quantidades significativamente maiores daquela observada no meio de cultura, mas muito inferiores às apresentadas pelo Vitrebond ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Concentração de flúor, alumínio e zinco (mediana, P25 e P75, n=9) nos extratos dos materiais

Material	Flúor* (µg/mL)	Alumínio** (µg/mL)	Zinco*** (µg/mL)
Vitrebond	55,26 (47,98-60,72) a	11,87 (9,80-5,83)	42,28 (38,04-46,58) a
Fuji Lining LC	15,74 (11,04-18,75) b	i.l.q.	0,74 (0,60-0,94) b
Vitremer	7,74(7,08-9,10) c	i.l.q.	0,41 (0,35-0,54) c
Fuji II LC	7,14 (6,98-9,37) c	i.l.q.	0,27 (0,24-0,38) d
Ketac Fil Plus	8,52 (7,47-9,15) c	i.l.q.	0,38 (0,38-0,41) cd
Ketac Molar Easymix	7,66 (6,92-9,88) c	i.l.q.	0,45 (0,37-0,48) c
DMEM (controle negativo)	i.l.q.	i.l.q.	0,03 (0,03-0,03) e

Letras iguais nas colunas denotam ausência de diferença estatística (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

*Limite mínimo de detecção igual a 0,031 µg/mL; **Limite mínimo de detecção igual a 1,0 µg/mL; ***Limite mínimo de detecção igual a 0,01 µg/mL; i.l.q = inferior ao limite de quantificação pelo método usado.

3 Identificação do monômero orgânico 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e do iodobenzeno (IB) nos extratos obtidos dos cimentos de ionômero de vidro

Na identificação do HEMA e do iodobenzeno, foram considerados dois parâmetros: o tempo de retenção e o fragmentograma, obtidos para cada um dos padrões injetados nas mesmas condições cromatográficas dos extratos dos CIVs.

A Figura 2 mostra os espectros de massa dos padrões HEMA e iodobenzeno. Os perfis cromatográficos obtidos por CG/EM, dos respectivos

padrões de HEMA e iodobenzeno, bem como dos extratos obtidos pela imersão dos corpos-de-prova dos diferentes CIVs em meio de cultura DMEM, estão ilustrados na Figura 3.

O monômero residual HEMA foi detectado nos extratos de todos os CIVs modificados por resina, enquanto o iodobenzeno foi identificado apenas no cromatograma do Vitrebond (Figura 3). Os CIVs convencionais não mostraram sinais cromatográficos da presença desses componentes.

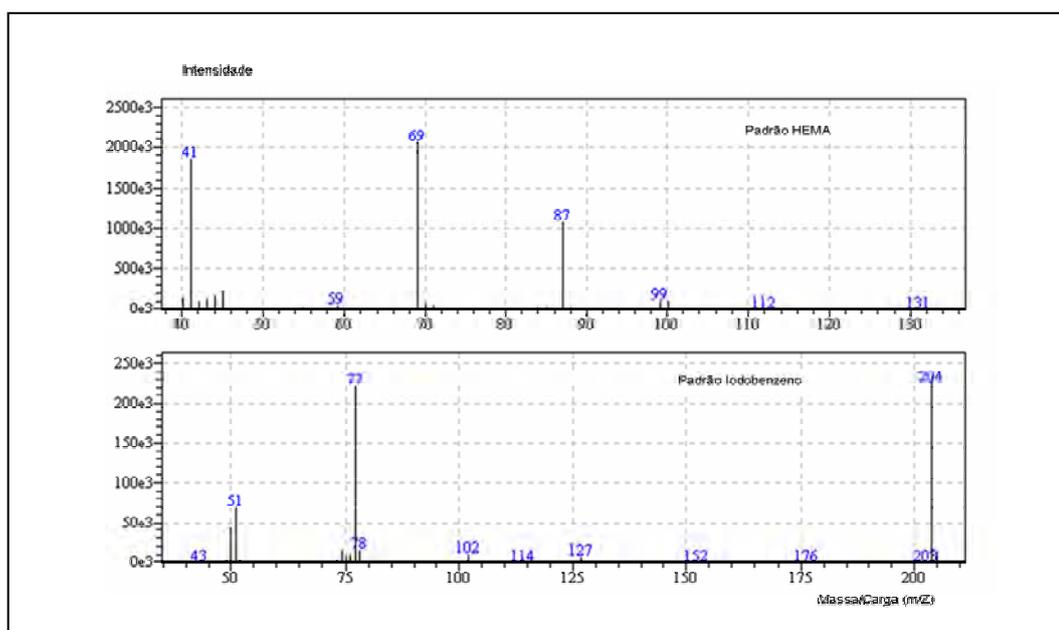


FIGURA 2 – Fragmentograma dos padrões HEMA e iodobenzeno.

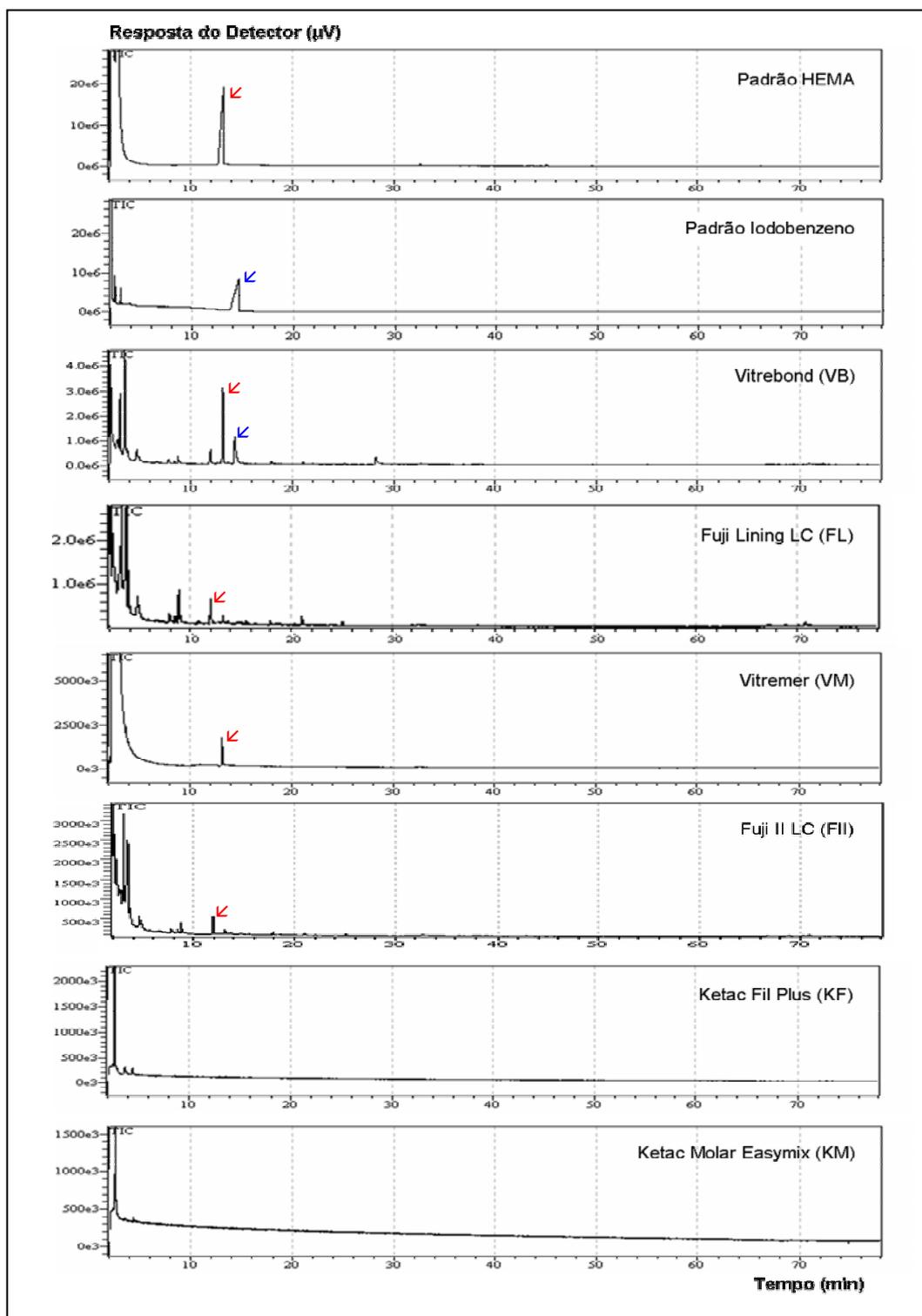


FIGURA 3 – Cromatogramas dos padrões HEMA e iodobenzeno e dos extratos obtidos dos diferentes cimentos de ionômero de vidro injetados nas mesmas condições (seta vermelha – HEMA; seta azul – iodobenzeno).

DISCUSSÃO

A quantidade de componentes liberados pelos materiais odontológicos exerce papel fundamental no seu comportamento biológico^{1,15,35}. Os CIVs modificados por resina tem sido considerados mais citotóxicos que os convencionais^{24,34,35}, porque, além da liberação de íons, como os convencionais, eles liberam também monômeros resinosos residuais e produtos da decomposição de fotoiniciadores^{15,22,35}, que estão diretamente relacionados com alterações que ocorrem em nível celular^{3,5,12,20,36}.

A natureza dos íons e/ou elementos inorgânicos liberados depende da composição química dos materiais; por isso, neste estudo, antes da análise dos extratos dos CIVs, foi realizada a quantificação dos elementos inorgânicos presentes nos corpos-de-prova dos diferentes materiais por meio de Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (EDXRF). Os elementos identificados em maior porcentagem foram estrôncio, silício e alumínio para todos os materiais, com exceção do Ketac Molar Easymix, que apresentou maiores porcentagens de lantânio, cálcio, silício e alumínio. O zinco foi detectado em grande quantidade apenas no Vitrebond. O flúor, embora presente em todos os CIVs, não foi identificado pelo fato de a metodologia utilizada permitir a detecção apenas dos elementos de sódio a urânio.

Os íons e/ou elementos inorgânicos presentes nos CIVs podem ser liberados durante a reação de presa ou pela solubilização do material com o tempo^{21,22,25}. Entretanto, em condições próximas ao pH neutro, conforme aquelas utilizadas no presente estudo, Czarnecka et al.⁶ (2002) observaram que o cálcio foi praticamente insolúvel, enquanto quantidades razoáveis de sódio, alumínio,

fósforo, silício e flúor foram liberadas pelos CIVs, com uma tendência à diminuição com o tempo.

Segundo Stanislawski et al.³⁵ (1999), o estrôncio não apresenta citotoxicidade em concentrações até 10 mM, o flúor e o alumínio são citotóxicos em concentrações superiores a 1 mM, enquanto o zinco é altamente citotóxico em concentrações tão baixas quanto 0,1 mM. Então, no presente estudo avaliou-se a quantidade de flúor, alumínio e zinco presentes nos extratos obtidos pela imersão dos corpos-de-prova dos diferentes CIVs em meio de cultura por 24 horas, uma vez que eles podem ser liberados em concentrações potencialmente citotóxicas pelos materiais estudados. O Vitrebond foi o único material que liberou concentrações de flúor e zinco ($55,26 \mu\text{g/mL} = 2,91 \text{ mM/mL}$ e $42,28 \mu\text{g/mL} = 0,65 \text{ mM/mL}$, respectivamente) suficientes para causar efeitos citotóxicos. O alumínio foi liberado em quantidades detectáveis pelo aparelho utilizado apenas no extrato do Vitrebond ($11,87 \mu\text{g/mL} = 0,44 \text{ mM/mL}$), porém quantidade esta não considerada citotóxica por Stanislawski et al.³⁵ (1999).

Diferenças podem ocorrer entre os diversos estudos por causa da metodologia empregada. Forss⁹ (1993) utilizou o método do azul de molibdênio para detecção do silício e espectrofotometria de absorção atômica para detecção de sódio, cálcio, estrôncio e alumínio, com a finalidade de analisar os extratos do Vitrebond e do Fuji Lining LC em água destilada. Verificou que o sódio, o silício e o estrôncio estavam presentes nos extratos de 24 horas dos dois materiais, enquanto o alumínio só foi detectado no extrato do Vitrebond e o cálcio não foi detectado. Lönnroth, Dahl²⁵ (2001) utilizando eletrodo seletivo para determinação de flúor e espectrometria de emissão óptica com acoplamento de

plasma para detecção do alumínio, observaram uma liberação de 47,5 µg/mL (2,5 mM/mL) de flúor e 29,5 µg/mL (1,1 mM/mL) de alumínio quando avaliaram o Fuji II LC recém-manipulado e relacionaram essa alta liberação com os severos efeitos citotóxicos apresentados por esse material sobre fibroblastos de linhagem L929, uma vez que, nessas concentrações, esses elementos inorgânicos são capazes de interferir na estabilidade das membranas celulares e inibir a atividade respiratória mitocondrial^{21,25,35}.

Os efeitos citotóxicos relacionados com os elementos químicos flúor, alumínio e zinco podem ser devidos, também, ao estresse oxidativo que eles causam sobre as células em cultura³³, à depleção da glutatona, à produção de espécies reativas de oxigênio e a outros mecanismos moleculares identificados como importantes fatores que levam à apoptose e/ou morte celular^{17,36}.

Os CIVs modificados por resina podem induzir citotoxicidade em diferentes graus por causa das diferentes concentrações de HEMA residual após a polimerização. Geralmente, os materiais usados como forradores apresentam uma maior concentração desse monômero na mistura final do que os restauradores por serem manipulados com menor proporção pó/líquido³⁰. O HEMA residual é facilmente liberado e tem a capacidade de se incorporar à dupla camada lipídica da membrana celular, provocando a sua solubilização¹² e exercendo elevado efeito citotóxico, mesmo em baixas concentrações². O HEMA provoca, também, entre outras alterações, a produção de espécies reativas de oxigênio e inibe o crescimento celular³, os quais, associados às alterações causadas pelos elementos inorgânicos liberados pelos CIVs, são fatores determinantes de apoptose e morte celular^{3,17}.

Além do HEMA, outros monômeros têm sido identificados em extratos aquosos de materiais resinosos e também apresentam potencial citotóxico e de indução de apoptose^{1,15,16}. Todos os extratos dos CIVs modificados por resina analisados nesta pesquisa por CG/EM apresentaram sinais cromatográficos de presença de HEMA, e, apenas para o Vitrebond, foi identificado o iodobenzeno, produto da decomposição do iniciador de polimerização cloreto de difenil iodo, o qual também apresenta efeitos citotóxicos sobre as células¹⁵. Embora neste estudo tenha sido realizada apenas a análise do HEMA e do iodobenzeno, os cromatogramas de alguns dos materiais apresentaram picos com diferentes tempos de retenção, sugerindo a liberação de outros monômeros e/ou produtos da decomposição de iniciadores de polimerização.

Pôde-se constatar, nesta pesquisa, que o Vitrebond foi o material que liberou a maior quantidade de íons, como o flúor e o zinco, e de componentes orgânicos residuais para o meio de cultura celular. Portanto, entre os CIVs estudados, parece ser aquele que apresenta o maior potencial citotóxico. Assim, outros estudos são necessários para determinar o real papel desses componentes liberados pelos CIVs na citotoxicidade e na biocompatibilidade desses materiais.

REFERÊNCIAS

1. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. Dent Mater. 2006; 22: 630-40.
2. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. J Endod. 1996; 22: 244-8.

3. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials*. 2005; 26: 745-53.
4. Cho E, Kopel H, White SN. Moisture susceptibility of resin-modified glass-ionomer materials. *Quintessence Int*. 1995; 26: 351-8.
5. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo B, et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Arch Oral Biol*. 1998; 43: 65-71.
6. Czarnecka B, Limanowska-Shaw H, Nicholson JW. Buffering and ion-release by a glass-ionomer cement under near-neutral and acidic conditions. *Biomaterials*. 2002; 23: 2783-8.
7. Erickson RL, Glasspoole EA. Bonding to tooth structure: a comparison of glass-ionomer and composite-resin systems. *J Esthet Dent*. 1994; 6: 227-44.
8. Exterkate RA, Damen JJ, ten Cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. *Caries Res*. 2005; 39: 509-13.
9. Forss H. Release of fluoride and other elements from resin-modified glass-ionomers in neutral and acidic conditions. *J Dent Res*. 1993; 72: 1257-62.
10. Forsten L. Fluoride release of glass ionomer. *J Esthet Dent*. 1994; 6: 216-22.
11. Forsten L. Fluoride release and uptake by glass ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials*. 1998; 19: 503-8.

12. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipids liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988; 67: 1438-41.
13. Gandolfi MG, Chersoni S, Acquaviva GL, Piana G, Prati C, Mongiorgi R. Fluoride release and absorption at different pH from glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 441-9.
14. Gao W, Smales RJ. Fluoride release/uptake of conventional and resin-modified glass ionomers, and compomers. *J Dent.* 2001; 29: 301-6.
15. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res.* 1998; 77: 2012-9.
16. Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J Biomed Mater Res.* 1999; 48: 772-7.
17. Goldberg M. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest.* 2008; 12: 1-8.
18. Hayacibara MF, Ambrosano GMB, Cury JA. Simultaneous release of fluoride and aluminium from dental materials in various immersion media. *Oper Dent.* 2004; 29: 16-22.
19. Hosoya Y, Garcia-Godoy F. Bonding mechanism of Ketac-Molar Aplicap and Fuji IX GP to enamel and dentin. *Am J Dent.* 1998; 11: 235-9.
20. Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater.* 2001; 17: 333-9.

21. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res.* 1997; 76: 1502-7.
22. Kawai K, Takaoka T. Fluoride, hydrogen ion and HEMA release from light-cured GIC restoratives. *Am J Dent.* 2002; 15: 149-52.
23. Kidd EAM, Toffenetti F, Mjör IA. Secondary caries. *Int Dent J.* 1992; 42: 127-38.
24. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2003; 28: 251-9.
25. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59: 34-9.
26. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quintessence Int.* 1994; 25: 587-9.
27. Mitra SB. Adhesion to dentin and physical properties of a light cured glass-ionomer liner/base. *J Dent Res.* 1991; 70:72-4.
28. Mjör IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. *J Am Dent Assoc.* 2005; 136: 1426-33.
29. Mount GJ. Clinical performance of glass-ionomers. *Biomaterials.* 1998; 19: 573-9.
30. 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.

31. Smales RJ, Gao W. In vitro caries inhibition at enamel margins of glass ionomer restoratives developed for the ART approach. *J Dent.* 2000; 28: 249-56.
32. Smith DC. Development of glass-ionomer cement systems. *Biomaterials.* 1998; 19: 467-78.
33. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials.* 2003; 24: 3-9.
34. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials.* 2003; 24: 3853-8.
35. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999; 49: 277-88.
36. Stanislawski L, Soheili-Majd E, Perianin A, Goldberg M. Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblast: protective effect of N-acetyl cysteine. *J Biomed Mater Res.* 2000; 51: 469-74.
37. Tyas MJ. Placement and replacement of restorations by selected practitioners. *Aust Dent J.* 2005; 50: 81-9.
38. Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements. *Int J Prosthodont.* 1990; 3: 215-9.
39. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry: the glass-ionomer cement. *Br Dent J.* 1972; 132: 133-5.
40. Woolford MJ, Chadwick RG. Surface pH of resin-modified glass polyalkenoate (ionomer) cements. *J Dent.* 1992; 20: 359-64.

Estudo 2

Citotoxicidade de Cimentos de Ionômero de Vidro sobre Células de Linhagem Odontoblástica



CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA

RESUMO

Objetivo: Avaliar o comportamento de células da linhagem odontoblástica MDPC-23, na presença de extratos obtidos de diferentes cimentos de ionômero de vidro (CIVs), quanto à atividade da enzima desidrogenase succínica, produção de proteína total, atividade da fosfatase alcalina e alteração da morfologia celular. **Métodos:** Para cada uma das três primeiras análises, foram utilizados oito corpos-de-prova (4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) de cada um dos materiais: Vitrebond (VB), Fuji Lining LC (FL), Vitremer (VM), Fuji II LC (FII), Ketac Fil Plus (KF) e Ketac Molar Easymix (KM), os quais foram imersos em 1,1 mL de meio de cultura DMEM e mantidos por 24 horas a 37°C para a obtenção dos extratos. Células da linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em placas de 24 compartimentos (30.000 células/cm²) por um período de 48 horas, em incubadora umidificada a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelos extratos obtidos dos materiais, e as células foram mantidas na incubadora por mais 24 horas. O meio de cultura DMEM puro foi usado como grupo controle negativo. Decorrido o período de incubação, a atividade da desidrogenase succínica foi determinada pelo teste colorimétrico do metiltetrazolio (MTT), a produção de proteína total pelo método de Lowry, e a atividade da fosfatase alcalina pela análise da

hidrolização da timolftaleína monofosfato. Os resultados foram analisados estatisticamente pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. Dois espécimes adicionais de cada grupo foram preparados para a análise da morfologia celular em MEV. **Resultados:** As porcentagens de atividade da desidrogenase succínica em relação ao grupo controle, que representou 100% de atividade dessa enzima, foram: VB (5,8%), VM (86,7%), FII (90,2%), KM (93,5%), FL (98,9%) e KF (102,5%). A produção de proteína total não sofreu alteração significativa quando as células foram mantidas em contato com o extrato do FL. Os extratos dos materiais KF, VM, KM, FII e VB promoveram produção de proteína total estatisticamente inferior em relação ao controle, cujas porcentagens corresponderam a 81,1%, 70,6%, 64,9%, 55,9% e 10,9%, respectivamente, daquela apresentada pelo controle. A atividade da fosfatase alcalina não foi influenciada pelos extratos do FL, VM, FII e KF e reduziu significativamente para o KM e o VB, correspondendo a 67,1% e 7,7%, respectivamente, em relação ao controle. O VB foi o único material que provocou alterações significativas na morfologia e no número de células. **Conclusão:** Os CIVs convencionais e modificados por resina avaliados neste estudo, com exceção do Vitrebond, apresentaram efeito citotóxico relativamente baixo sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro; odontoblastos, respiração celular; proteínas; fosfatase alcalina; citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) foram introduzidos na década de 70 e, posteriormente, com a incorporação de monômeros polimerizáveis hidrófilos, como o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), à formulação desses cimentos, surgiram os CIVs modificados por resina, com melhores propriedades físicas e mecânicas⁵⁹. Como esses materiais são usados em contato com o complexo dentino pulpar, devem ser consideradas não apenas essas propriedades, mas também a compatibilidade biológica⁵².

Os CIVS convencionais apresentam baixa liberação de calor durante a reação de presa¹¹, rápida neutralização dos componentes ácidos¹⁰, liberam íons geralmente em baixas concentrações^{16,19,23} e, portanto, são considerados de baixa citotoxicidade^{36,38,50}.

A incorporação do HEMA a esses materiais determinou uma redução na quantidade de água disponível para a reação ácido-base, e como consequência, uma redução na velocidade dessa reação^{5,31,56}. A rápida polimerização associada à lenta reação ácido-base determina a liberação de componentes ácidos por um período de tempo prolongado e a manutenção do pH do cimento baixo por mais tempo^{57,58}. Além disso, a não-conversão total do HEMA da forma monomérica para a polimérica, somada à sua hidrofilia e ao seu baixo peso molecular favorecem a sua difusão através dos túbulos dentinários, podendo causar alterações às células pulpares^{4,37,54}. Assim, a introdução desse monômero resinoso aos CIVs tem sido associada ao aumento dos seus efeitos citotóxicos^{27,36,39,40,50,54}.

Existe, também, uma grande preocupação com a proporção pó/líquido indicada para a manipulação desses materiais. Geralmente, nos CIVs

modificados por resina indicados para forramento, a proporção pó/líquido é menor do que nos CIVs restauradores para que se obtenha uma melhor consistência, porém isso resulta em uma maior concentração de HEMA na mistura final do material⁴⁶ e, conseqüentemente, em uma maior liberação de monômeros residuais^{22,46}. Além disso, pode ocorrer uma maior solubilização desses cimentos em meio úmido, com liberação de íons, como flúor, alumínio, silício, estrôncio e zinco, em maiores concentrações³⁹.

Como os cimentos de ionômero de vidro liberam componentes com capacidade de difundirem-se através dos túbulos dentinários e com potencial de causarem alterações no tecido pulpar, testes de citotoxicidade em cultura de células são indicados para a avaliação inicial do potencial de agressão²¹. Entre esses testes, o da avaliação da atividade respiratória mitocondrial celular tem sido amplamente utilizado, por ser um método que apresenta adequada sensibilidade^{1,39,43,50,53}. Porém, em adição a esse teste que detecta a viabilidade celular, métodos que permitam avaliar outras funções celulares, tais como produção de proteínas⁹ e atividade de enzimas, como a fosfatase alcalina, que é uma glicoproteína envolvida no processo de mineralização²⁴, devem ser incluídos na avaliação da citotoxicidade desses materiais.

Como os efeitos tóxicos dos componentes liberados dos materiais odontológicos forradores e restauradores, in vivo, ocorrem primeiramente sobre os odontoblastos, que são as células mais superficiais da polpa, e como os mecanismos de resposta dessas células aos componentes bioativos desses materiais ainda não foram completamente esclarecidos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito citotóxico dos extratos obtidos de dois CIVs convencionais, dois CIVs modificados por resina restauradores e dois CIVs

modificados por resina para forramento/base sobre cultura de células de linhagem odontoblástica.

MATERIAL E MÉTODO

A Materiais utilizados

Para a realização deste estudo foram utilizados dois CIVs modificados por resina para forramento/base (Vitrebond – 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA e Fuji Lining LC – GC, Tokyo, Japão), dois CIVs modificados por resina para restauração (Vitremer -3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA e Fuji II LC – GC, Tokyo, Japão) e dois CIVs convencionais para restauração (Ketac Fil Plus - 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA e Ketac Molar Easymix – 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA). A composição dos materiais, a classificação, a proporção pó/líquido (em peso), o tempo de fotoativação recomendado pelos respectivos fabricantes (TFR) para os CIVs modificados por resina, bem como o tempo de espera para presa inicial (TPI) dos CIVs convencionais estão apresentados na Tabela 1.

B Métodos

1 Confeção dos corpos-de-prova e obtenção dos extratos dos cimentos de ionômero de vidro

Os materiais foram manipulados à temperatura ambiente ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), na proporção pó/líquido (em peso) recomendada pelos fabricantes (Tabela 1).

Tabela 1 - Cimentos de ionômero de vidro comercialmente disponíveis usados no estudo

Nome Comercial (Fabricante)	Classificação*/ Indicação	Composição (porcentagem em peso)	Proporção	
			Pó/Líquido	TFR/TPI**
Vitrebond (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV modificado por resina / forramento- base	Pó: pó de vidro (flúor-alumino-silicato de vidro) > 95%; cloreto de difenil iodo < 2% Líquido: copolímeros dos ácidos acrílico e itacônico - 35%-45%; 2-hidroxietil metacrilato(HEMA)- 20%-30%; água - 30%-40%	1,4:1	30 s
Fuji Lining LC (GC, Tokyo, Japão)	CIV modificado por resina / forramento- base	Pó: alumino-silicato de vidro - 100% Líquido: ácido poliacrílico - 65%-75%; 2-hidroxietil metacrilato - 8%-10%; outros componentes - 5%-15%	1,4: 1	30 s
Vitremer (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV modificado por resina / restauração	Pó: vidro tratado (flúor-alumino-silicato de vidro) - 90%-100%; persulfato de potássio < 1% Líquido: copolímeros dos ácidos acrílico e itacônico - 45%-50%; água - 25%-30%; 2-hidroxietil metacrilato - 15%-20%	2,5:1	40 s
Fuji II LC (GC, Tokyo, Japão)	CIV modificado por resina / restauração	Pó: alumino-silicato de vidro - 100% Líquido: ácido poliacrílico - 20%-22%; 2-hidroxietil metacrilato - 35%-40%; outros componentes - 5%-15%; 2,2,4 trimetil hexametileno dicarbonato - 5%-7%; trietileno glicol dimetacrilato - 4%-6%	3,0:1	40 s
Ketac Fil Plus (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV / restauração	Pó: pó de vidro (cristais de flúor-alumino-silicato) ≈ 100% Líquido: água - 60%-65%; ácido polietileno policarbonico - 30%-40%; ácido tartárico - 5%-10%	3,2:1	7 min
Ketac Molar Easymix (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV / restauração	Pó: pó de vidro (cristais de flúor-alumino-silicato) - 85%-95%; ácido poliacrílico - 5%-15% Líquido: água - 55%-65%; ácido polietileno policarbonico - 25%-35%; ácido tartárico - 5%-10%	2,9:1	5 min

* De acordo com McLean et al.⁴², 1994.

**TFR: tempo de fotoativação recomendado pelo fabricante; TPI: tempo de espera para presa inicial.

Em seguida, foram introduzidos, com o auxílio de seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, Brasil), em matrizes bipartidas de aço inoxidável medindo 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura previamente esterilizadas, colocadas sobre placa de vidro e tira de poliéster. Sobre a superfície do material, foi colocada outra tira de poliéster, para evitar a inibição da polimerização da camada mais superficial do material pelo contato com o oxigênio, e uma lâmina de vidro de 1 mm de espessura, a qual foi pressionada contra a matriz com um peso de 500 gf, para eliminação dos excessos de material. Para a fotoativação dos CIVs modificados por resina, foi utilizado um aparelho fotopolimerizador de luz halógena (Optilux 500, Demetron/Kerr Corp., Orange, CA, EUA), o qual foi posicionado diretamente sobre a lâmina de vidro. A intensidade de luz do aparelho fotopolimerizador ($470 \pm 10 \text{ mW/cm}^2$) foi avaliada previamente à confecção dos corpos-de-prova por meio de um radiômetro (Optilux Radiometer, model 100 P/N 10503, Demetron Research Corporation, Danbury, CT, EUA). O tempo de fotoativação dos CIVs modificados por resina foi estabelecido de acordo com as recomendações de seus fabricantes específicos (Tabela 1). Os CIVs convencionais permaneceram na matriz metálica, sob pressão e luz ambiente, pelo período de 10 minutos para que ocorresse a presa inicial dos materiais.

Em seguida, os excessos de material foram removidos com o auxílio de lâmina de bisturi número 11 (Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japão), os corpos-de-prova foram removidos das matrizes de aço bipartidas e permaneceram em incubadora com 100% de umidade, a 37°C, durante 60 minutos. Após esse período, cada corpo-de-prova (superfície total = $50,24 \text{ mm}^2$) foi imerso em um compartimento contendo 1,1 mL de meio de cultura celular

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Sigma Chemical CO., St Louis, MO, EUA), sem soro fetal bovino, para minimizar a desnaturação protéica durante os procedimentos de obtenção dos extratos dos materiais. Os corpos-de-prova permaneceram em contato com o meio de cultura por 24 horas, em incubadora umidificada a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Decorrido esse período, o meio de cultura contendo os componentes liberados pelos materiais iônicos (extrato) foi coletado para ser usado nas análises para avaliação da citotoxicidade sobre cultura de células.

O meio de cultura puro DMEM (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, EUA) foi mantido nas mesmas condições que os extratos e foi usado como grupo controle negativo.

2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos obtidos dos cimentos de ionômero de vidro

Esta avaliação foi realizada por meio das análises da atividade da enzima desidrogenase succínica, da produção de proteína total, da atividade da fosfatase alcalina e da morfologia celular, usando cultura de células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23²⁵ (*Mouse Dental Papillae Cells*).

2.1 Colocação dos extratos dos materiais em contato com as células

Utilizando placas esterilizadas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA), cerca de 6×10^4 células MDPC-23, nas passagens 49 a 52, foram cultivadas em cada compartimento com 1 mL de meio de cultura DMEM (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de

soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA). As placas foram mantidas por 48 horas em incubadora (Isotemp, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) com 100% de umidade, a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 1 mL dos extratos obtidos dos materiais em estudo ou por novo meio de cultura (grupo controle negativo). Antes de serem colocados em contato com as células, os extratos, que apresentaram pH entre 8,4 e 8,6, tiveram-no ajustado para 7,4, usando-se HCl 1,0M, para evitar a influência desse fator na citotoxicidade. Na seqüência, foram filtrados em filtro de 0,22 µm (Millipore Ind. Com. Ltda, SP, Brasil), para eliminar partículas em suspensão e promover a esterilização, e foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Grand Island, NY, EUA).

As placas contendo as células em contato com os extratos obtidos dos materiais ou com o meio de cultura puro (controle negativo) foram mantidas em incubadora pelo período adicional de 24 horas, para posterior avaliação da citotoxicidade.

2.2 Análise da atividade da desidrogenase succínica (SDH)

A análise da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), enzima que representa a taxa de respiração mitocondrial das células, foi realizada usando-se o teste colorimétrico do metiltetrazolio⁴⁴ (MTT assay). Para isso, foram utilizados, para cada grupo, oito compartimentos das placas que

continham as células em contato com os extratos dos materiais ou com o meio de cultura.

Decorridas 24 horas de incubação das células com os extratos dos materiais ou com o meio de cultura, estes foram removidos dos compartimentos e substituídos por 1 mL de uma solução composta por 900 μ L de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino e 100 μ L de solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) preparada numa concentração de 5 mg do sal/mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS). Após 4 horas de incubação a 37°C, o meio de cultura contendo MTT de cada compartimento foi substituído por 600 μ L de solução de isopropanol (J.T. Baker – Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México) acidificado em HCL a 0,04 N. As placas foram mantidas em temperatura ambiente, por 30 minutos, para que ocorresse a solubilização dos cristais de formazan que se formaram pela clivagem dos anéis de tetrazólio pela enzima desidrogenase succínica. Em seguida, três alíquotas de 100 μ L de cada compartimento foram transferidas para placas de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA), e a densidade óptica foi medida por espectrofotometria em Leitor Universal de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France), num comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram obtidos pelas médias, em valores de absorbância, das três alíquotas de cada compartimento e demonstraram o efeito de cada material sobre a atividade da desidrogenase succínica em relação ao grupo controle, que representou 100% de atividade.

2.3 Produção de proteína total (PT)

A dosagem de proteína total foi realizada de acordo com o protocolo de Lowry et al.⁴¹ (1951). Para este teste, foram utilizadas oito amostras para cada grupo experimental e controle. Decorrido o período de incubação das células com os extratos dos materiais ou com o DMEM puro (controle), estes foram aspirados e os compartimentos das placas de acrílico contendo as células foram lavados três vezes com 2 mL de PBS a 37°C. Em seguida, foi realizada a lise das células utilizando-se 2 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) em cada compartimento. Após 40 minutos em temperatura ambiente, a solução contendo as células lisadas foi homogeneizada, e 1 mL de cada compartimento foi transferido para tubos de ensaio previamente esterilizados e devidamente identificados. Em seguida, 1 mL de solução reagente de Lowry (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado em todos os tubos, que foram agitados por 10 segundos em agitador de tubos (Phoenix AP 56, Araraquara, SP, Brasil) e permaneceram por 20 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse período, 500 µL de Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) foram acrescentados em cada um dos tubos, que foram novamente agitados por 10 segundos em agitador de tubos, e mantidos por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para placas de 96 compartimentos, e a absorbância de cada amostra foi lida em leitor de ELISA (Bio-Rad, modelo 3550 – UV, Microplate Reader, Hercules, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 655 nm. Foi feita a média das absorbâncias das três alíquotas de cada compartimento, e a concentração de proteína total foi calculada utilizando-se a

curva padrão e foi expressa em $\mu\text{g/mL}$. A porcentagem em relação ao controle, que representou 100% de produção de proteína total, foi calculada para cada grupo usando-se os valores das medianas.

2.4 Atividade da fosfatase alcalina (FAL)

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada segundo o protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil), utilizando-se as mesmas oito amostras de cada grupo experimental e controle que foram usadas para a determinação da proteína total. Neste ensaio foi utilizado o substrato de timolftaleína monofosfato, que é hidrolisado pela fosfatase alcalina, liberando a timolftaleína. A alteração do pH promove a interrupção da atividade enzimática e a formação da cor azul, característica do produto da reação, que é medida fotometricamente⁴⁷. Em tubos de ensaio devidamente identificados, foram colocados 50 μL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 μL de tampão dietanol amina (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit). Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria (Fanem, Guarulhos, São Paulo, Brasil), a 37°C, e, após 2 minutos, 50 μL das soluções resultantes da lise das células de cada compartimento foram transferidos para os tubos testes, que foram agitados gentilmente. No tubo padrão foi adicionado 50 μL da solução padrão (reagente nº 4 do kit). Todos os tubos permaneceram em banho-maria por 10 minutos, e, em seguida, 2 mL de reagente de cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250mmol/L – reagente nº 3 do kit) foram acrescentados em todos os tubos, que foram levemente agitados em agitador de tubos (Phoenix AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil). Decorrido um período de 30 minutos, a

absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Genesys 10UV Thermo Electron Scientific Instruments, Madison, WI, EUA), no comprimento de onda de 590 nm, e a atividade da fosfatase alcalina (FAL) foi expressa em μmol de timolftaleína/h/mL, calculada pela equação:

$$\text{FAL} = \text{Valor obtido no espectrofotômetro} \times \text{Fator}$$

Sendo:

$$\text{Fator} = \frac{45 \text{ (valor dado pelo fabricante do Kit)}}{\text{Valor obtido no espectrofotômetro para o tubo padrão}} \times \frac{60 \text{ min}}{1000 \text{ mL}}$$

$$\text{Valor obtido no espectrofotômetro para o tubo padrão} \quad 1000 \text{ mL}$$

As porcentagens de atividade da fosfatase alcalina em relação ao grupo controle (100%) foram calculadas usando-se as medianas de cada grupo.

2.5 Análise da morfologia celular

Dois espécimes de cada material e dois do grupo controle foram preparados para a análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA), previamente esterilizadas, foram posicionadas na base dos compartimentos das placas de 24 compartimentos, tendo, em cada compartimento, sido cultivadas 6×10^4 células da linhagem MDPC-23. As placas foram mantidas por 48 horas em incubadora com 100% de umidade, a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 1 mL dos extratos obtidos dos materiais iônicos ou por 1 mL do meio de

cultura (grupo controle negativo), e as placas foram incubadas por mais 24 horas. Decorrido esse período, os extratos foram aspirados, os compartimentos contendo as lamínulas com as células aderidas foram lavados com PBS, e 1 mL da solução de glutaraldeído a 2,5% (LabCenter Materiais para Laboratórios e Hospitais, Campinas, São Paulo, Brasil) foi imediatamente aplicado em cada compartimento e mantido por 2 horas para a fixação das células MDPC-23. Sequencialmente, as células foram lavadas por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem) e pós-fixadas em 200 μ L de tetróxido de ósmio a 1%, por 60 minutos. Então, essas células foram lavadas por duas vezes em 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem), por outras duas vezes com 1 mL de água destilada (15 minutos cada lavagem), sendo, então, desidratadas em 1 mL de etanol 30%, 50% e 70%, 2 x 95% e 2 x 100% (30 minutos em cada solução). Em seguida, as lamínulas de vidro com as células foram imersas por 60 minutos (três trocas de 20 minutos) em 200 μ L do solvente de baixa tensão superficial HMDS (1,1,1,3,3,3-Hexamethyl-disilazane - Sigma, Chemical Company, St. Louis, MO, EUA). Finalmente, a solução de HMDS foi desprezada, e os recipientes foram tampados e mantidos no dessecador por 12 horas. Decorrido esse tempo, as lamínulas com as células foram removidas do fundo dos compartimentos dos recipientes plásticos com o auxílio de sonda exploradora e pinça cirúrgica, fixadas em *stubs* de alumínio, metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Digital Scanning Electron Microscope Zeiss DSM-940A, Oberkochen, Alemanha). A análise da morfologia celular foi realizada de forma descritiva, de acordo com de Souza Costa et al.⁴⁸ (1999).

3 Análise estatística

Os dados referentes às análises de atividade da enzima desidrogenase succínica (absorbância), produção de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) e atividade da fosfatase alcalina ($\mu\text{molTIMOLftaleina/mL}$) não assumiram distribuição normal. Assim, para testar a hipótese nula de que não existiam diferenças entre as respostas celulares para os diferentes materiais, foi usado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e, sempre que essa hipótese foi rejeitada, realizou-se a comparação dos grupos dois a dois para identificar as diferenças, usando o teste de Mann-Whitney.

Todos os testes estatísticos foram avaliados considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

1 Análise da atividade da desidrogenase succínica (SDH)

Os resultados da análise da atividade da desidrogenase succínica após o contato das células MDPC-23 por um período de 24 horas com os extratos obtidos pela imersão dos corpos-de-prova em meio de cultura por 24 horas estão apresentados na Tabela 2. O Vitrebond foi o material que apresentou o maior efeito citotóxico ($p < 0,05$), promovendo uma atividade da desidrogenase succínica de apenas 5,8%, quando comparado com o grupo controle (meio de cultura – DMEM). O Vitremer apresentou baixa citotoxicidade, determinando atividade da enzima desidrogenase succínica igual a 86,7% em relação ao controle, sem diferença estatística em relação a este. Os extratos do Fuji Lining LC, Fuji II LC, Ketac Fil Plus e Ketac Molar Easymix apresentaram valores de

atividade dessa enzima semelhantes entre si ($p > 0,05$), os quais corresponderam a 98,3%, 90,2%, 102,5% e 93,5%, daqueles apresentados pelo controle, e não mostraram diferença estatística quando comparados a este.

Tabela 2 – Atividade da desidrogenase succínica após 24 horas de contato dos extratos obtidos de cimentos de ionômero de vidro com as células MDPC-23 em cultura (absorbância a 570 nm)

Material		Atividade da Desidrogenase Succínica	
		Absorbância*	% do controle
CIVs modificados por resina para forramento/base	Vitrebond	0,0569 (0,0509-0,0768) c**	5,8
	Fuji Lining LC	0,9610 (0,9026-1,0054) a	98,3
CIVs modificados por resina restauradores	Vitremer	0,8478 (0,7317-0,8844) b	86,7
	Fuji II LC	0,8814 (0,7648-0,9887) ab	90,2
CIVs convencionais restauradores	Ketac Fil Plus	1,0018 (0,9091-1,0351) a	102,5
	Ketac Molar Easymix	0,9136 (0,8750-0,9707) a	93,5
DMEM (controle negativo)		0,9775 (0,8095-1,0235) ab	100

*Mediana (P25 - P75), n=8.

**Letras iguais denotam ausência de diferença estatística (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

2 Produção de proteína total (PT)

Os efeitos dos extratos dos diferentes materiais estudados sobre a produção de proteínas pelas células MDPC-23 são mostrados na Tabela 3. Para

o extrato do Fuji Lining LC, foi observado um pequeno aumento na produção de proteína total, não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle DMEM ($p > 0,05$). Todos os demais CIVs determinaram uma menor produção de proteína total quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$), sendo as porcentagens correspondentes a 81,1%, 70,6% e 64,9%, respectivamente, nos cimentos Ketac Fil Plus, Vitremer e Ketac Molar Easymix. O Fuji II LC e o Vitrebond foram os materiais que determinaram as menores concentrações de proteína total em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), com porcentagens iguais a 55,9% e 10,9% daquela apresentada pelo grupo controle.

Tabela 3 – Concentração de proteína total após 24 horas de contato dos extratos obtidos de cimentos de ionômero de vidro com as células MDPC - 23 em cultura

Material		Proteína Total	
		$\mu\text{g/mL}^*$	% do controle
CIVs modificados por resina para forramento/base	Vitrebond	3,37 (2,78-4,60) e**	10,9
	Fuji Lining LC	39,21 (31,23-41,63) a	126,5
CIVs modificados por resina restauradores	Vitremer	21,88 (21,04-25,14) c	70,6
	Fuji II LC	17,33 (16,58-19,00) d	55,9
CIVs convencionais restauradores	Ketac Fil Plus	25,14 (23,02-26,53) b	81,1
	Ketac Molar Easymix	20,10 (18,61-23,71) c	64,9
DMEM (controle negativo)		30,98 (30,24-31,38) a	100

*Mediana (P25 - P75), n=8.

**Letras iguais denotam ausência de diferença estatística (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

3 Atividade da fosfatase alcalina (FAL)

A atividade da fosfatase alcalina não foi alterada de forma significativa pelos extratos dos cimentos de ionômero de vidro Fuji Lining LC, Vitremer, Fuji II LC e Ketac Fil Plus quando esses grupos foram comparados com o grupo controle DMEM ($p > 0,05$). O Ketac Molar Easymix provocou uma redução da atividade da fosfatase alcalina, sendo essa atividade correspondente a 67,1% daquela apresentada pelo controle. O Vitrebond foi o material que promoveu a menor atividade da fosfatase alcalina ($0,12 \mu\text{mol timolftaleina/h/mL}$), a qual correspondeu a apenas 7,7% daquela observada para o grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade da fosfatase alcalina após 24 horas de contato dos extratos obtidos de diferentes cimentos de ionômero de vidro com as células MDPC - 23 em cultura

		Atividade da Fosfatase Alcalina	
Material		($\mu\text{mol timolftaleina/h/mL}$)*	% do controle
CIVs modificados por resina para forramento/base	Vitrebond	0,12 (0,10-0,13) c**	7,7
	Fuji Lining LC	1,83 (1,44-1,90) a	118,0
CIVs modificados por resina restauradores	Vitremer	1,58 (1,42-1,66) a	101,9
	Fuji II LC	1,71 (1,50-1,90) a	110,3
CIVs convencionais restauradores	Ketac Fil Plus	1,53 (1,40-1,68) a	98,7
	Ketac Molar Easymix	1,04 (0,71-1,31) b	67,1
DMEM (controle negativo)		1,55 (1,28-2,08) a	100

*Mediana (P25 - P75), n=8.

**Letras iguais denotam ausência de diferença estatística (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

4 Morfologia celular

No grupo controle negativo (DMEM), as células apresentaram-se aderidas ao substrato de vidro em grande número. Morfologicamente, essas células exibiram forma irregular, amplo citoplasma e numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos, que pareceram ser responsáveis pela adesão das células ao substrato. Presença de estruturas globulares sugerindo células em mitose também foi observada (Figura 1G). Para os CIVs Fuji Lining LC, Fuji II LC e Ketac Fil Plus, foram observadas células com morfologia e em número semelhantes aos do grupo controle (Figura 1 B, D, E).

O CIV modificado por resina para forramento, Vitrebond, mostrou severo efeito citotóxico caracterizado pela morte da maioria das células odontoblastóides, tendo as células que permaneceram sobre a superfície da lamínula de vidro apresentado morfologia arredondada e nenhum ou poucos prolongamentos celulares curtos originados de sua membrana (Figura 1 A). Para o Vitremer (Figura 1C) e para o Ketac Molar Easymix (Figura 1 F), a morfologia das células mostrou-se semelhante à do grupo controle, embora elas não tenham coberto toda a área da lamínula de vidro.

DISCUSSÃO

Os materiais odontológicos liberam componentes com capacidade de difundir-se através dos túbulos dentinários e causar alterações no tecido pulpar^{15,20,26,49}. Assim, testes de citotoxicidade em cultura de células são indicados para realizar a avaliação inicial do potencial de agressão desses materiais sobre tecidos vivos. Na presente pesquisa, células imortalizadas da linhagem odontoblástica MDPC-23, as quais apresentam marcadores fenotípicos

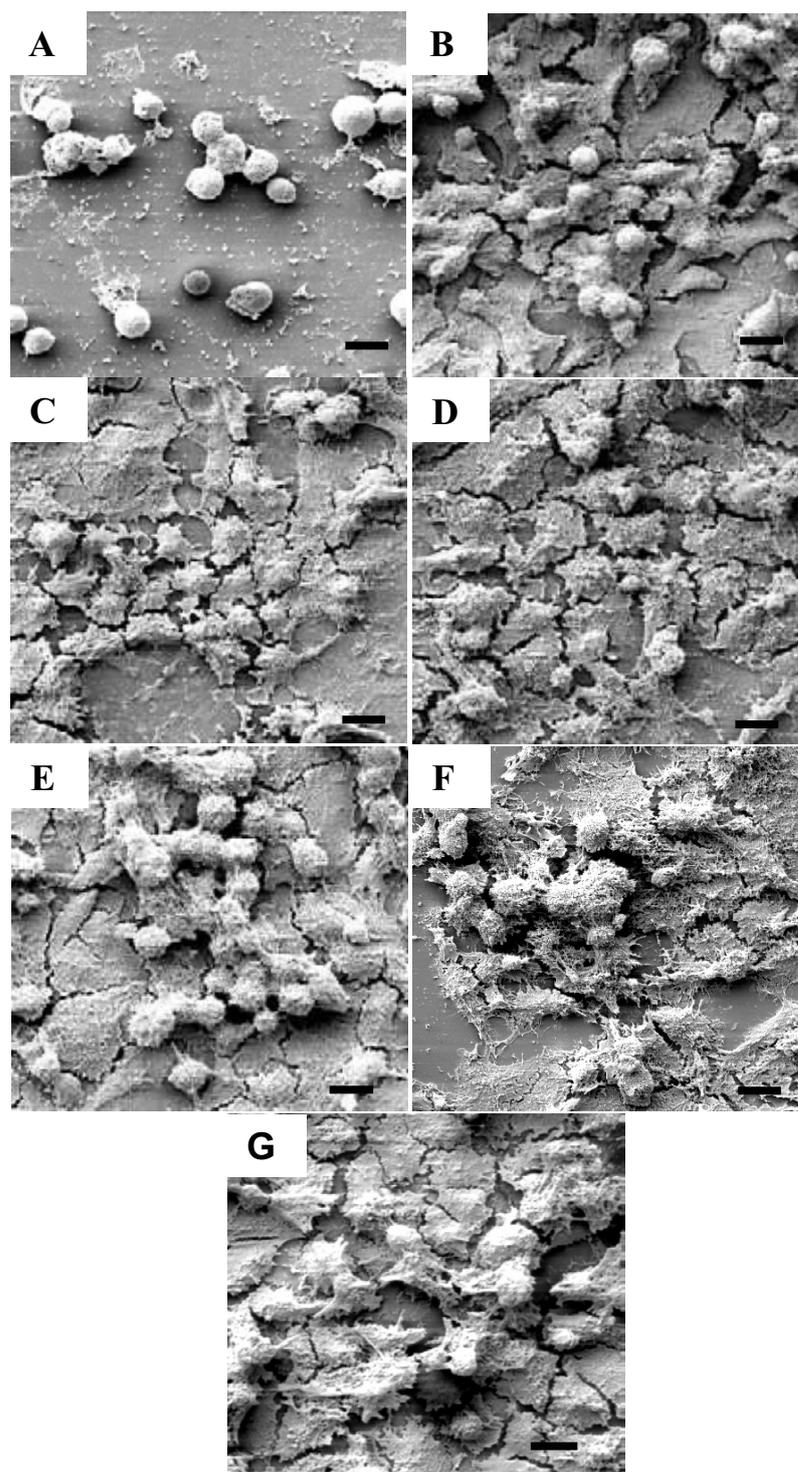


FIGURA 1 - Fotomicrografia em MEV de células MDPC-23 aderidas à lamínula de vidro após contato por 24 horas com os extratos obtidos dos materiais ionoméricos. A = Vitrebond, B = Fuji Lining, C = Vitremer, D = Fuji II LC, E = Ketac Fil Plus, F = Ketac Molar Easymix, G = DMEM (controle). Aumento original 500x, barra = 20 μ m.

de odontoblastos²⁵, foram selecionadas para a avaliação da citotoxicidade de extratos contendo os produtos liberados de CIVs convencionais e modificados por resina.

Apesar das diferenças metodológicas entre os diversos estudos, os CIVs modificados por resina vêm sendo considerados mais citotóxicos do que os convencionais^{36,50,54}. Isso tem sido atribuído ao fato de que, além da alteração do pH local^{12,57,58} e da liberação de íons^{16,19,23}, como ocorre nos CIVs convencionais, os modificados por resina determinam, também, a liberação de monômeros residuais^{33,54}.

No presente trabalho, os extratos dos materiais foram obtidos pela manutenção dos corpos-de-prova em meio de cultura por 24 horas, a uma temperatura de 37°C, e tiveram o pH ajustado para 7,4, uma vez que células em cultura apresentam melhores condições de metabolismo e multiplicação em valores de pH que variam de 7,0 a 7,7¹⁴. Assim, a variável pH foi eliminada como possível fator responsável pela citotoxicidade dos materiais estudados, o que permitiu que apenas o efeito dos íons e/ou elementos atômicos inorgânicos e monômeros orgânicos residuais liberados no meio de cultura fosse avaliado como fator de citotoxicidade para as células MDPC-23. Assim, pelo teste do MTT, foi possível observar, entre os efeitos citotóxicos produzidos pelos componentes liberados pelo CIV modificado por resina Vitrebond, uma intensa interferência na atividade respiratória mitocondrial, a qual leva à redução do metabolismo e morte celular. Aranha et al.¹ (2006) e de Souza Costa et al.⁵⁰ (2003), utilizando a mesma linhagem celular, entretanto com a colocação dos corpos-de-prova diretamente em contato com as células, e Souza et al.⁵³ (2006) e de Mendonça et al.⁴³ (2007), utilizando os extratos dos materiais, obtiveram

resultados semelhantes aos deste trabalho, com o Vitrebond apresentando elevada citotoxicidade quando comparado aos demais materiais.

O tipo de cimento de ionômero de vidro (convencional ou modificado por resina) e a quantidade de componentes liberados parecem exercer papel fundamental no comportamento biológico dos diferentes materiais^{3,22,50}. Nos CIVs modificados por resina, assim como nos convencionais, alguns íons, tais como o flúor e íons constituintes da matriz, como alumínio, cálcio, silício, estrôncio e zinco, podem ser liberados durante a reação de presa ou pela posterior solubilização em meio úmido^{32,33,39,54}. Entretanto, para Stanislawski et al.⁵⁴ (1999), a concentração desses íons liberados por CIVs, com exceção do zinco, é insuficiente para induzir efeitos tóxicos em cultura primária de células pulpares. Segundo esses autores, o flúor e o alumínio apresentam citotoxicidade às células em concentrações superiores a 1 mM, e o zinco já se mostra altamente citotóxico em concentrações tão baixas quanto 0,1 mM. Em análises realizadas por Giro*, entre os CIVs estudados, apenas o Vitrebond liberou concentrações de flúor e de zinco (2,91 mM/mL e 0,65 mM/mL, respectivamente) suficientes para causar efeitos tóxicos sobre as células, os quais foram mostrados pelas várias metodologias usadas neste trabalho.

Analisando os CIVs convencionais e os modificados por resina restauradores, observou-se que nenhum deles provocou alterações significativas

* Giro EMA. Análise elementar inorgânica e identificação de componentes orgânicos liberados por diferentes cimentos de ionômero de vidro (trabalho a ser submetido à publicação).

na taxa de respiração mitocondrial das células MDPC-23 quando comparados com o grupo controle negativo (Tabela 2).

As porcentagens de atividade respiratória observadas quando essas células foram colocadas em contato com os extratos de 24 horas dos CIVs convencionais Ketac Fil Plus e Ketac Molar Easymix, bem como do Fuji II LC (CIV modificado por resina), foram de 102,5%, 93,5% e 90,2%, respectivamente, em relação ao controle, e não houve diferença estatisticamente significativa entre esses materiais. O Vitremer promoveu atividade respiratória mitocondrial de 86,7% em relação ao controle, a qual, embora não tenha apresentado diferença significativa em relação ao Fuji II LC, foi estatisticamente inferior à dos CIVs convencionais. Kan et al.³² (1997), avaliando a citotoxicidade de extratos obtidos de CIVs convencionais e de CIVs modificados por resina após filtração e ajuste do pH para 7,2-7,3 sobre cultura de fibroblastos de camundongos, demonstraram uma redução do metabolismo celular, avaliado pela taxa de respiração mitocondrial de, no máximo, 30%. De acordo com esses autores, o CIV convencional (Ketac Fil) e o CIV modificado por resina (Fuji II LC) apresentaram porcentagens de metabolismo de $85,7\% \pm 17,5\%$ e $102,8\% \pm 9,8\%$, respectivamente, em relação ao controle, as quais são bastante próximas daquelas apresentadas pelo presente estudo.

Por outro lado, Lönnroth, Dahl³⁹ (2001), trabalhando com fibroblastos de camundongos L929 e realizando a filtração e o ajuste do pH (7,0) dos extratos obtidos de diferentes CIVs, observaram uma alta citotoxicidade com menos de 30% de células viáveis, tendo sido o Fuji II LC o material mais citotóxico. Esses autores justificaram os resultados obtidos para esse material por uma elevada liberação de íons flúor ($47,5 \text{ ppm} = 2,5 \text{ mM}$) e alumínio ($29,5 \text{ ppm} = 1,1 \text{ mM}$)

para o meio de cultura, os quais podem interferir na estabilidade da membrana celular ou inibir a atividade respiratória mitocondrial. Provavelmente, essa elevada liberação de íons flúor e alumínio pelo Fuji II LC tenha ocorrido pelo fato de os extratos terem sido obtidos pela imersão de corpos-de-prova não polimerizados em meio líquido por 24 horas ou pela manutenção de corpos-de-prova recentemente polimerizados em meio líquido por um período de seis dias. Resultados completamente diferentes foram observados na presente pesquisa, em que os extratos de 24 horas foram obtidos pela imersão de corpos-de-prova no meio de cultura somente 60 minutos após a reação de presa inicial, com menos de 15% de redução da taxa de respiração mitocondrial das células para a maioria dos CIVs estudados, com exceção do Vitrebond, que apresentou 94,2% de redução dessa atividade celular em relação ao grupo controle.

Os CIVs modificados por resina podem induzir citotoxicidade em diferentes graus, provavelmente em razão de diferenças na sua composição. O líquido desses cimentos contém monômeros resinosos, tais como o HEMA, em diferentes concentrações. Além disso, os cimentos usados como forradores, por serem manipulados com uma menor proporção pó/líquido, com a finalidade de conseguir uma melhor consistência, apresentam uma maior concentração de HEMA⁴⁶. Este monômero residual, além de ser facilmente liberado e difundir-se através da dentina por causa do seu baixo peso molecular (PM = 130) e da sua hidrofília^{4,20,37}, tem a capacidade de se incorporar na dupla camada lipídica da membrana celular provocando a sua solubilização¹⁷, exercendo, assim, elevado efeito citotóxico mesmo em baixas concentrações⁴. Além disso, o HEMA inibe o crescimento celular de maneira dose-dependente⁷ pela depleção da glutathione intracelular e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que

determinam alterações no ciclo celular, resultando em apoptose⁷. Em altas concentrações, esse monômero tem a capacidade de inibir a fosforilação intracelular da tirosina que está relacionada com as atividades celulares³⁰. Bakopoulou et al.² (2009) mostraram, ainda, que extratos obtidos de CIVs modificados por resina, em especial do Vitrebond, causaram severos efeitos genotóxicos sobre cultura de linfócitos, os quais foram caracterizados pelo aumento significativo das frequências de trocas de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas, e, também, redução do índice médio de proliferação celular.

Considerando-se que os componentes liberados pelos materiais odontológicos têm a capacidade de determinar a redução da atividade respiratória mitocondrial, que é uma função primordial para a manutenção da viabilidade celular, e, também, podem prejudicar funções celulares específicas, como a produção de proteínas⁹ e a atividade enzimática^{8,24}, neste estudo, além da atividade respiratória mitocondrial, avaliou-se a produção de proteína total e a atividade da fosfatase alcalina, as quais estão relacionadas com a deposição e a mineralização da matriz dentinária e da óssea²⁴.

Com relação à produção de proteínas, as células MDPC-23 se comportaram de maneira completamente diferente em relação aos dois CIVs modificados por resina para forramento, usados nesta pesquisa. O Fuji Lining LC não alterou significativamente a produção de proteínas em relação ao grupo controle, enquanto o Vitrebond promoveu uma severa redução da síntese de proteína total. Uma das causas prováveis para essa diferença pode se a liberação de elevada quantidade de flúor pelo Vitrebond

(2,91 mM/mL)*, pois, segundo Consiglio et al.⁹ (1998), uma concentração de flúor de 1,5 mM é suficiente para reduzir a síntese de proteínas em torno de 40% em relação ao controle. Todos os CIVs convencionais e os modificados por resina restauradores estudados promoveram uma redução da produção de proteína total, sendo essa redução mais pronunciada no Fuji II LC (44,1% em relação ao controle). Como esses materiais liberaram concentrações de flúor semelhantes, em torno de 0,4 mM/mL*, e o pH foi ajustado para 7,4 em todos os extratos, sugere-se que diferenças nas concentrações de outras substâncias liberadas, como o HEMA ou outros monômeros resinosos, tenham contribuído para a menor produção de proteínas apresentada pelas células em contato com o extrato do Fuji II LC.

Segundo Kawase et al.³⁴ (1988) e Kémoun et al.³⁵ (2007), a atividade da fosfatase alcalina é baixa quando as células estão em fase proliferativa e aumenta quando estas se apresentam em confluência, sendo o período mais efetivo de estimulação o quinto dia de cultivo. Outros autores trabalhando com células de linhagem odontoblástica obtiveram maior atividade da fosfatase alcalina aos seis ou sete dias de cultivo^{25,28,29}. Neste estudo, foram cultivadas 30.000 células/cm², e, após 48 horas, quando foram aplicados os extratos obtidos dos materiais, estas se apresentavam em confluência de praticamente 80%, sendo, então, a atividade da fosfatase alcalina avaliada no terceiro dia de cultivo. Embora este não seja considerado o período de máxima atividade dessa

* Giro EMA. Análise elementar inorgânica e identificação de componentes orgânicos liberados por diferentes cimentos de ionômero de vidro (trabalho a ser submetido à publicação).

enzima, pode-se observar que os CIVs Fuji Lining LC, Vitremer e Ketac Fil Plus não diferiram estatisticamente do controle, enquanto uma menor atividade estatisticamente significativa foi observada para o Vitrebond e para o Ketac Molar Easymix (7,7% e 67,1% daquela apresentada pelo controle, respectivamente) (Tabela 4). Esses dados sugerem que, embora tenha ocorrido uma redução na produção de proteína total, a capacidade de mineralização em resposta aos CIVs estudados foi mantida, com exceção para o Vitrebond, uma vez que este material determinou severa redução tanto da produção de proteínas como da atividade da fosfatase alcalina. O Ketac Molar Easymix provocou uma redução da atividade da fosfatase alcalina de 32,9% em relação ao controle, o que pode prejudicar a hidrolização de ésteres fosfato e, conseqüentemente, a fosforilação do colágeno, reduzindo a deposição de íons cálcio sobre a matriz formada²⁴. Assim, in vivo, a inibição da atividade da fosfatase alcalina associada à redução da produção de proteína total podem comprometer a formação da matriz de dentina pelos odontoblastos na parede pulpar correspondente ao assoalho da cavidade, bem como a sua mineralização^{8,24}.

Os efeitos citotóxicos causados pelos extratos dos materiais sobre cultura de células podem ser considerados de intensidade severa (menos de 30% de atividade respiratória celular em relação ao controle), moderada (entre 30% e 60% de atividade em relação ao controle), leve (entre 60% e 90% de atividade em relação ao controle) e não-significativa (90% ou mais de atividade em relação ao controle)^{39,40}.

Neste estudo, analisando-se o comportamento dos CIVs convencionais, pôde-se verificar que o Ketac Fil Plus não determinou redução da atividade

respiratória mitocondrial das células MDPC-23 quando esta atividade foi comparada com aquela do grupo controle, entretanto, determinou alteração da produção de proteína total (81,1% em relação ao controle). O Ketac Molar Easymix também não alterou significativamente a atividade respiratória mitocondrial, mas promoveu uma alteração significativa na produção de proteínas e na atividade da fosfatase alcalina (64,9% e 67,1% em relação ao controle, respectivamente). Como os dados na literatura são escassos, principalmente em relação ao Ketac Molar Eaymix, sugere-se que esses resultados sejam determinados pelas diferenças na composição desses materiais.

O Vitrebond (CIV modificado por resina para forramento/base) mostrou-se severamente citotóxico às células MDPC-23, promovendo intensas alterações na morfologia celular e a morte da maioria das células, como foi observado na análise realizada em MEV, e causando reduzida atividade da desidrogenase succínica (5,8%), produção de proteína total (10,9%) e atividade da fosfatase alcalina (7,7%), quando comparado com o grupo controle que representou 100% de atividade celular. Corroborando esses resultados, outros trabalhos realizados *in vitro* têm demonstrado que esse material apresenta intenso efeito citotóxico sobre células MDPC-23 em cultura^{1,43,50,53}. Em adição, estudo *in vivo* realizado em dentes humanos demonstrou que o Vitrebond aplicado como agente capeador pulpar direto provocou uma notável resposta inflamatória crônica mediada por células gigantes e macrófagos, a qual impediu o completo reparo pulpar⁴⁵. Entretanto, o mesmo material aplicado sobre dentina, em estudos *in vivo*, mostrou-se biocompatível^{13,18,51,52}, sendo a espessura remanescente desse substrato no assoalho da cavidade considerada como um fator importante na

proteção da polpa dental contra os efeitos deletérios dos produtos liberados pelos materiais odontológicos⁵². Além disso, Titley et al.⁵⁵ (1996) mostraram que os componentes do Vitrebond reagem quimicamente com a dentina, resultando na formação de cristais que obliteram parcialmente os túbulos, o que clinicamente pode reduzir a permeabilidade dentinária.

Ao contrário do Vitrebond, o Fuji Lining LC, outro CIV modificado por resina para forramento/base, promoveu uma redução não-significativa da atividade respiratória mitocondrial em comparação com o controle DMEM (1,69%) e não alterou de forma estatisticamente significativa a produção de proteína total e a atividade da fosfatase alcalina. Como a proporção pó/líquido usada para a manipulação dos dois cimentos é a mesma (1,4/1), essa diferença de comportamento dos extratos desses materiais em contato com as células pode ser explicada pelo fato de o líquido do Fuji Lining LC ser composto por apenas 8%-10% de HEMA, enquanto a concentração desse componente no líquido do Vitrebond é de 20%-30%, resultando em uma maior quantidade desse monômero na mistura, e, conseqüentemente, maior liberação. Corroborando essa hipótese, Palmer et al.⁴⁶ (1999) mostraram, em seu estudo, que a quantidade de HEMA liberado é maior para o Vitrebond do que para o Fuji Lining LC. Entretanto, os efeitos citotóxicos do Vitrebond não devem ser atribuídos apenas à liberação de HEMA, uma vez que outros componentes tóxicos, tais como íons flúor e zinco^{9,54}, e os produtos da decomposição do fotoiniciador cloreto de difenil iodo (cloro-, iodo- e bromobenzeno)^{21,22} também são liberados em concentrações tóxicas por esse material.

Comparando os CIVs modificados por resina restauradores usados neste estudo, o Fuji II LC teve um comportamento semelhante ao Vitremer com relação

à atividade respiratória mitocondrial e à atividade da fosfatase alcalina, porém reduziu de forma estatisticamente significativa a secreção de proteína total, fato que pode ser atribuído a diferenças nas concentrações de monômeros resinosos na sua composição, tais como o HEMA e o trietileno glicol dimetacrilato, os quais são extremamente citotóxicos^{3,22}.

Embora, no geral, os resultados do presente estudo tenham mostrado uma baixa citotoxicidade dos CIVs estudados, com exceção do Vitrebond, esses resultados não podem ser diretamente extrapolados para situações clínicas^{2,6,54}. Antes de indicar a utilização de um material para procedimentos em dentes humanos, mais estudos *in vitro* e, principalmente, estudos pré-clínicos são necessários. Entretanto, vários estudos *in vitro*^{32,39,46,54} parecem concordar com o fato de que, durante a reação de presa dos CIVs e quando os cimentos de ionômero de vidro são aplicados em um meio úmido, eles liberam componentes químicos, que podem causar efeitos tóxicos quando colocados em contato direto com as células pulpares, e este é um importante fator a ser considerado quando da escolha do material para uso clínico.

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que os cimentos de ionômero de vidro convencionais e os modificados por resina avaliados, com exceção do Vitrebond, apresentaram efeito citotóxico relativamente baixo sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

REFERÊNCIAS

1. Aranha AMF, Giro EMA, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006; 22: 864-9.
2. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxicity and citotoxic effects of different types of dental cement on normal cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2009; 672: 103-12.
3. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006; 22: 630-40.
4. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. *J Endod.* 1996; 22: 244-8.
5. Bourke AM, Walls AW, McCabe JF. Light-activated glass polyalkenoate(ionomer) cements: the setting reaction. *J Dent.* 1992; 20: 115-20.
6. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxicol.* 2005; 25:101-8.
7. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials.* 2005; 26: 745-53.

8. Chen CC, Chen RCS, Huang ST. Enzymatic responses of human deciduous pulpal fibroblasts to dental restorative materials. *J Biomed Mater Res.* 2002; 60: 452-7.
9. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo B, et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Arch Oral Biol.* 1998; 43: 65-71.
10. Cook WD. Dental polyelectrolyte cements. I. Chemistry of the early stages of setting reaction. *Biomaterials.* 1982; 3: 232-6.
11. Crisp S, Jennings MA, Wilson AD. A study of the temperature changes occurring in setting dental cements. *J Oral Rehabil.* 1987; 5: 139-44.
12. Czarnecka B, Limanowska-Shaw H, Nicholson JW. Buffering and ion-release by glass-ionomer cement under near-neutral and acidic conditions. *Biomaterials.* 2002; 23: 2783-8.
13. Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EMA, Oliveira MF, de Souza Costa CA. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in non human primate teeth. *J Oral Rehabil.* 2006, 33: 452-61.
14. Eagle H. The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 1973; 82: 1-8.
15. 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.
16. Forsten L. Fluoride release and uptake by glass ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials.* 1998; 19: 503-8.

17. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipids liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988; 67: 1438-41.
18. Gaintantzopoulou MD, Willis GP, Kafrawy AH. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. *Am J Dent.* 1994; 7: 39-42.
19. Gao W, Smales RJ. Fluoride release/uptake of conventional and resin-modified glass ionomers, and compomers. *J Dent.* 2001; 29: 301-6.
20. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996; 24: 125-8.
21. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 687-95.
22. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive released and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res.* 1998; 77: 2012-9.
23. Griffin SG, Hill RG. Influence of glass composition on the properties of glass polyalkenoate cements. Part IV. Influence of fluoride content. *Biomaterials.* 2000; 21: 693-8.
24. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingival of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res.* 1995; 74: 1374-81.
25. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998; 37: 233-49.

26. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999; 27: 557-64.
27. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 361-5.
28. Inoue M, LeGeros RZ, Inoue M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Yamamoto T, et al. In vitro response of osteoblast-like and odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites. *J Biomed Mater Res.* 2004; 70A: 585-93.
29. Jiang HB, Tian WD, Liu LK, Xu Y. In vitro odontoblast-like cell differentiation of cranial neural crest cells induced by fibroblast growth factor 8 and dentin non-collagen proteins. *Cell Biol Int.* 2008; 32: 671-8.
30. Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater.* 2001; 17: 333-9.
31. Kakaboura A, Elaidis G, Palaghias G. An FTIR study on the setting mechanism of resin-modified glass ionomer restoratives. *Dent Mater.* 1996; 12: 173-8.
32. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res.* 1997; 76: 1502-7.
33. Kawai K, Takaoka T. Fluoride, hydrogen ion and HEMA release from light-cured GIC restoratives. *Am J Dent.* 2002; 15:149-52.
34. Kawase T, Sato S, Miake K, Saito S. Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. *Adv Dent Res.* 1988; 2: 234-9.

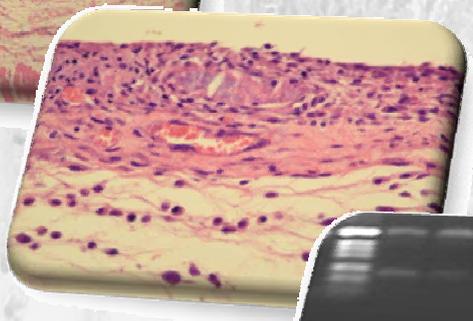
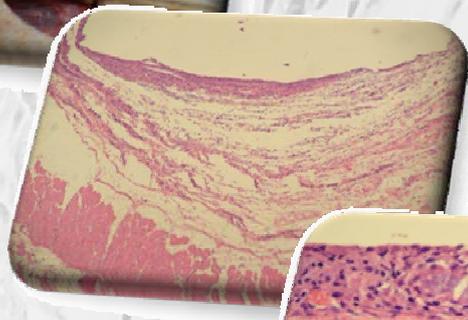
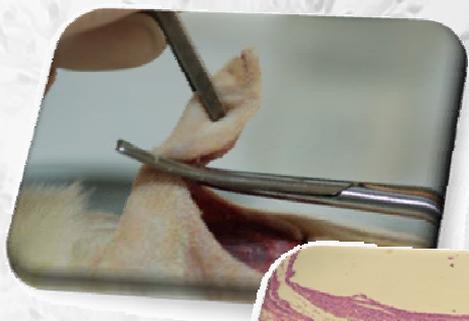
35. Kémoun P, Laurencin-Dalícieux S, Rue, J, Farges, JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007; 329: 283-94.
36. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2003; 28: 251-9.
37. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2008 NOV 12. doi: 10.1007/s10565-008-9110-x.
38. 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.
39. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59: 34-9.
40. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2003; 61: 52-6.
41. Lowry OH, Rosebrongh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenolreagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-75.
42. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quintessence Int.* 1994; 25: 587-9.

43. de Mendonça AA, Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: e102-8.
44. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
45. Nascimento ABL, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CAS. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent.* 2000, 13: 28-34.
46. 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.
47. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem.* 1970; 16: 431-6.
48. de Souza Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999; 15: 434-41.
49. de Souza Costa CA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater.* 2001;17: 230-40.
50. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials* 2003; 24: 3853-8.
51. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res.* 2007; 81: 175-84.

52. de Souza Costa CA, Giro EMA, Nascimento ABL, 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 Mater.* 2003; 19: 739-46.
53. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling J, Giro EMA, de Souza Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 838-44.
54. 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; 49: 277-88.
55. Titley KC, Smith DC, Chernecky R. SEM observations of the reactions of the components of a light-activated glass polyalkenoate (ionomer) cement on bovine dentine. *J Dent.* 1996; 24: 411-6.
56. Wan ACA, Yap AUJ, Hastings GW. Acid-base complex reactions in resin-modified and conventional glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999; 48: 700-4.
57. Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements. *Int J Prosthodont.* 1990; 3: 215-9.
58. Woolford MJ, Chadwick RG. Surface pH of resin-modified glass polyalkenoate (ionomer) cements. *J Dent.* 1992; 20: 359-64.
59. Xie D, Brantley BM, Culbertson G, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16: 129-38.

Estudo 3

Biocompatibilidade e Influência de Cimentos de Ionômero de Vidro sobre a Secreção de Mediadores Inflamatórios



BIOCOMPATIBILIDADE E INFLUÊNCIA DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO SOBRE A SECREÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivos comparar, histologicamente, a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de cimentos de ionômero de vidro (CIVs) convencionais e modificados por resina e avaliar a expressão dos genes que codificam para as citocinas inflamatórias Interleucina - 1 beta (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Para isso, foram utilizados dois CIVs modificados por resina para forramento/base (Vitrebond -3M/ESPE e Fuji Lining LC – GC), dois CIVs modificados por resina para restauração (Vitremer – 3M/ESPE e Fuji II LC – GC) e dois CIVs convencionais para restauração (Ketac Fil Plus e Ketac Molar Easymix - 3M/ESPE). Vinte e quatro tubos de polietileno foram preenchidos com cada um dos materiais e implantados na região dorsal de 42 animais. Cada animal recebeu, sob anestesia, quatro implantes, sendo dois com cada material, os quais foram determinados por sorteio. Como grupo controle foi utilizada a guta-percha. Após 7 ou 15 dias da realização dos implantes, os animais foram anestesiados, o tecido conjuntivo contendo os implantes foi removido, e os animais foram sacrificados com sobredose anestésica. Para cada período experimental, seis implantes de cada material foram fixados em formol e processados para análise histológica utilizando microscopia de luz, e seis implantes de cada material foram imersos em trisol e congelados em freezer a -80°C. Posteriormente, as amostras congeladas foram

trituras para extração do RNA total, que foi utilizado para a síntese do cDNA para análise por RT-PCR. No período de 7 dias, não houve diferença estatística na resposta inflamatória para os diferentes CIVs (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Entretanto, aos 15 dias, a reação inflamatória em resposta ao Ketac Molar Easymix apresentou-se mais intensa do que para os demais CIVs (Mann-Whitney, $p < 0,05$), com exceção do Vitrebond. Todos os materiais estudados induziram a expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α , observando-se que, para o Fuji Lining LC, as bandas correspondentes ao TNF- α apresentaram menor intensidade, em comparação aos demais materiais, no período de 15 dias. Dentro das condições experimentais deste trabalho, pôde-se concluir que: 1 – de modo geral, os CIVs estudados apresentaram compatibilidade biológica aceitável, embora, para o Ketac Molar Easymix e o Vitrebond, a reação inflamatória tenha persistido até o período mais longo de análise, e 2 – todos os CIVs induziram a expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α , porém menor expressão de TNF- α foi observada para o Fuji Lining LC.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro; materiais biocompatíveis; reação em cadeia da polimerase; mediadores da inflamação; interleucinas.

INTRODUÇÃO

Os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) têm sido amplamente utilizados em odontologia como selantes de fossas e fissuras, material restaurador, para cimentação e para base e forramento de cavidades³⁴. O interesse nesses materiais tem aumentado em razão de sua adequada biocompatibilidade^{7,14,49-51}, adesão à dentina e ao esmalte¹⁰, módulo de

elasticidade e coeficiente de expansão térmica semelhantes aos da dentina⁴ e efeito cariostático devido à liberação de flúor^{11,13,15,19,55}.

Entretanto, a lenta reação de presa, a sensibilidade à umidade nos estágios iniciais de presa, a alta solubilidade e a baixa resistência ao desgaste e à fratura dos CIVs convencionais^{6,35} levaram à introdução dos CIVs modificados por resina, aos quais foram incorporados monômeros hidrófilos e fotoiniciadores⁵⁶ que, apesar de melhorarem as propriedades físicas e mecânicas dessa categoria de materiais⁵⁹, determinaram um aumento na sua citotoxicidade em relação aos CIVs convencionais^{21,26,29,30,48,52}.

A maior citotoxicidade é atribuída à quantidade considerável de HEMA (2-hidroxietil metacrilato) residual liberada por esses materiais depois da polimerização, uma vez que esse monômero pode difundir-se facilmente através dos túbulos dentinários por causa da sua hidrofilia e do seu baixo peso molecular^{3,16,27}. Além do HEMA, componentes como os fotoiniciadores e produtos da sua decomposição também contribuem para aumentar a citotoxicidade dos CIVs modificados por resina^{17,18}.

A capacidade dos produtos liberados pelos materiais odontológicos de alterar a viabilidade e a função celular influencia diretamente a resposta dos tecidos vivos^{44,45}. Estudos in vitro demonstraram que monômeros residuais têm a capacidade de reduzir a atividade mitocondrial de macrófagos pulpares⁴⁴ e inibir a secreção de interleucina -1 (IL-1 β) e de fator de necrose tumoral (TNF- α)⁴⁵, que são as principais citocinas que participam do processo inflamatório. Esses monômeros podem, também, apresentar efeito inibitório sobre algumas células imunocompetentes e, ao mesmo tempo, estimular outras células a produzirem

sinais para proliferação de linfócitos e produção de citocinas²⁵. Além disso, podem ativar o sistema complemento⁴¹, exercendo, portanto, um papel importante na resposta pulpar. Esses resultados sugerem que os CIVs modificados por resina têm potencial para causar reação inflamatória severa quando usados in vivo. Entretanto, estudos realizados em dentes de cães¹⁴, de macacos^{9,12,36,53} e de humanos^{49,50} demonstraram que esses materiais são biologicamente aceitáveis quando aplicados sobre dentina, que é considerada como um importante fator na proteção da polpa dental contra os efeitos dos produtos liberados pelos materiais odontológicos^{49,50}.

Porém, quando aplicados diretamente sobre o tecido conjuntivo subcutâneo⁵¹ e pulpar⁷ de animais, os CIVs modificados por resina podem desencadear intensa reação inflamatória inicial. Em dentes humanos, foi verificado que esses materiais, quando aplicados diretamente sobre o tecido pulpar, sofrem uma elevada solubilidade e que os produtos liberados podem atingir áreas profundas da polpa, provocando resposta inflamatória crônica persistente³⁷.

Assim sendo, devido ao uso cada vez mais freqüente dos CIVs em odontologia e diante dos resultados obtidos em estudos in vitro e in vivo, são necessárias mais avaliações biológicas que permitam detectar alterações no metabolismo celular e na resposta tecidual, de forma a melhor esclarecer os efeitos das diferentes formulações desses materiais quando são aplicadas sobre o complexo dentino-pulpar.

PROPOSIÇÃO

- 1- Comparar histologicamente a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de CIVs convencionais e CIVs modificados por resina.
- 2- Avaliar a expressão dos genes que codificam para as citocinas inflamatórias IL- 1 β e TNF- α , em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, após implante com diferentes CIVs.

MATERIAL E MÉTODO

1 Materiais

Para a realização deste estudo foram utilizados dois CIVs modificados por resina para forramento/base (Vitrebond – 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA e Fuji Lining LC – GC, Tokyo, Japão), dois CIVs modificados por resina para restauração (Vitremer -3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA e Fuji II LC – GC, Tokyo, Japão) e dois CIVs convencionais para restauração (Ketac Fil Plus - 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA e Ketac Molar Easymix – 3M/ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA). A composição dos materiais, a proporção pó/líquido (em peso), o tempo de fotoativação recomendado pelo fabricante (TFR), bem como o tempo de espera para presa inicial (TPI) do CIV convencional estão apresentados na Tabela 1.

A guta-percha (DENTISPLY Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) foi usada como controle do experimento.

Tabela 1 - Apresentação dos materiais usados no estudo

Nome Comercial (Fabricante)	Composição (porcentagem em peso)	Proporção Pó/Líquido	TFR/TPI*
Vitrebond (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA)	Pó: pó de vidro (flúor-alumino-silicato de vidro) > 95%; cloreto de difenil iodo < 2% Líquido: copolímeros dos ácidos acrílico e itaconico - 35%-45%; 2-hidroxietil metacrilato (HEMA)- 20%-30%; água - 30%-40%	1,4:1	30 s
Fuji Lining LC (GC, Tokyo, Japan)	Pó: alumino-silicato de vidro - 100% Líquido: ácido poliacrílico - 65%-75%; 2-hidroxietil metacrilato - 8%-10%; outros componentes - 5%-15%	1,4:1	30 s
Vitremer (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA)	Pó: vidro tratado (flúor-alumino-silicato de vidro) - 90%-100%; persulfato de potássio < 1% Líquido: copolímeros dos ácidos acrílico e itaconico - 45%-50%; água - 25%-30%; 2-hidroxietil metacrilato - 15%-20%	2,5:1	40 s
Fuji II LC (GC, Tokyo, Japan)	Pó: alumino-silicato de vidro - 100% Líquido: ácido poliacrílico - 20%-22%; 2-hidroxietil metacrilato - 35%-40%; outros componentes - 5%-15%; 2,2,4 trimetil hexametileno dicarbonato - 5%- 7%; triétileno glicol dimetacrilato - 4%-6%	3,0:1	40 s
Ketac Fil Plus (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA)	Pó: pó de vidro (cristais de flúor-alumino- silicato) ≈ 100% Líquido: água - 60%-65%; ácido polietileno policarbonico - 30%-40%; ácido tartárico - 5%-10%	3,2:1	7 min
Ketac Molar Easymix (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA)	Pó: pó de vidro (cristais de flúor-alumino- silicato) - 85%-95%; ácido poliacrílico - 5%- 15% Líquido: água - 55%-65%; ácido polietileno policarbonico - 25%-35%; ácido tartárico - 5%-10%	2,9:1	5 min
Pontas de Guta- percha (DENTISPLY Ind. e Com. Ltda, RJ, Brasil)	Guta-percha; óxido de zinco; sulfato de bário; pigmento orgânico	-	-

* TFR: tempo de fotoativação recomendado pelo fabricante; TPI: tempo de espera para presa inicial.

2 Método

2.1 - Implantação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos

Após aprovação pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Processo CEEA nº 25/2007 (Anexo), foram utilizados 42 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, Holtzman) pesando entre 210 g e 250 g, os quais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, com dieta regular e água a vontade.

Em fluxo laminar vertical (Bio Protector Plus 12 – Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil), tubos de polietileno esterilizados, com 10 mm de comprimento e diâmetro interno de 1,5 mm, tiveram uma das extremidades fechada com o auxílio de pinça hemostática aquecida. Imediatamente antes dos procedimentos de implante no tecido conjuntivo subcutâneo dos animais, esses tubos, em número de 24 por material (12 para a análise histológica e 12 para a análise das citocinas inflamatórias), foram preenchidos, com o auxílio de seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, Brasil) e pontas em forma de agulha (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, Brasil), com os cimentos de ionômero de vidro, manipulados de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes, na proporção pó/líquido (em peso) recomendada. Os materiais fotopolimerizáveis foram fotoativados com aparelho Optilux 500 (Demetron/Kerr Corp., Orange, CA, EUA) de acordo com o tempo recomendado pelos fabricantes. A intensidade de luz da unidade fotoativadora ($470 \pm 10 \text{ mW/cm}^2$) foi checada regularmente usando-se um radiômetro (Optilux Radiometer, model 100, Kerr, Danbury, CT, EUA). Os cimentos de ionômero de vidro convencionais tomaram presa na

ausência de luz por 10 minutos. No grupo controle, os tubos de polietileno foram preenchidos com pontas de guta-percha (DENTISPLY Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, Brasil).

Em seguida, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal do anestésico Quetamina (Ketamina[®] - Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,08 mL/100 g de peso corpóreo, associado ao relaxante muscular e anestésico Cloridrato de Xylazina (Dopaser[®] - Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,04 mL/100 g de peso corpóreo. Após anestesia, os animais foram estabilizados em uma mesa cirúrgica. Na região dorsal, correspondente à área de realização dos implantes, foi feita a tricotomia e a desinfecção com álcool iodado (95% de álcool e 5% de iodo), seguido de álcool 70%. Na linha média, no sentido longitudinal em relação ao corpo do animal, foram realizadas duas pequenas incisões (cerca de 8 mm de comprimento), uma mais anterior e outra mais posterior. Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, o tecido subcutâneo foi divulsionado de tal forma que, para cada incisão, foram preparadas duas lojas cirúrgicas, uma de cada lado da incisão central, a uma profundidade de aproximadamente 18 milímetros. Em condições assépticas, os tubos de polietileno preenchidos com os materiais foram implantados nas quatro lojas subcutâneas de cada animal, posicionados paralelamente à incisão com a extremidade aberta, onde os materiais experimentais e controle permaneceram em contato com o tecido conjuntivo, voltada em direção à cabeça do animal. Cada animal recebeu quatro implantes, sendo estes de dois materiais diferentes, que foram determinados por sorteio.

Em seguida, as bordas das incisões foram aproximadas e suturadas com fio de seda trançada nº 4-0 montado em agulha de 1,7 cm (TECHNEW - Comércio e Industria Ltda, Rio de Janeiro, Brasil).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais onde receberam dieta regular e água a vontade. No primeiro dia pós-operatório foi administrado Paracetamol (Medley S/A Indústria Farmacêutica, Campinas, São Paulo, Brasil), na dose de 300 mg/Kg de peso corporal, por via oral³². Os animais foram avaliados diariamente para a detecção de possível infecção pós-operatória que, quando presente, determinou a substituição por um novo animal.

Decorridos os períodos pós-operatórios de 7 ou 15 dias, os animais foram novamente anestesiados, foram feitas a tricotomia na região dorsal e a desinfecção da mesma forma que na primeira sessão. Em seguida, o tecido subcutâneo contendo os implantes foi cuidadosamente removido com o auxílio de tesoura cirúrgica, deixando-se suficiente margem de segurança em torno dos implantes. As peças destinadas à análise histológica foram colocadas sobre discos de papel filtro e imersas em formol a 10% (pH 7,2), onde permaneceram por 48 horas. Para as análises por RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da polimerase em cadeia), as peças foram colocadas em *ependorf* devidamente identificados contendo 1mL de Trisol (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA). Estes foram mantidos em gelo até serem levados para armazenamento em freezer a -80°C (Revco – VLT 1786-5-D38 - Kendro Laboratory Products – Ashville, NC, USA) para posterior avaliação da expressão de genes que codificam para as citocinas inflamatórias: Interleucina - 1 β (IL-1 β) e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α).

Após a realização das biópsias, os animais foram sacrificados utilizando-se sobredose de anestésico.

2.2 Preparo das lâminas e Análise histológica

Após fixação por 48 horas, as peças de tecido conjuntivo contendo os implantes foram incluídas a vácuo em parafina, os tubos de polietileno foram seccionados ao meio e cuidadosamente removidos e os espaços deixados foram preenchidos com parafina líquida. Em seguida, cortes seriados de 6 µm de espessura foram obtidos usando-se micrótomo rotatório (AOTEC - Spencer 820, Buffalo, NY, EUA) e navalhas descartáveis (LEICA, model 818, Alemanha). Esses cortes foram montados em lâminas de vidro, corados com hematoxilina e eosina e com tricrômico de Masson e avaliados em microscópio de luz (Carl Zeiss JENA - JENAMED 2 , Alemanha).

A avaliação das reações teciduais foi realizada por um único examinador com experiência, o qual desconhecia grupo e período aos quais as lâminas pertenciam. O evento histológico “reação inflamatória aos materiais implantados” foi avaliado na área de tecido adjacente ao material, junto à abertura dos tubos, e foi classificado em escores, de acordo com de Souza Costa et al.⁴⁷ (2000): Escore 0 – ausente/não-significativa (nenhuma ou poucas células inflamatórias adjacentes à abertura do tubo, caracterizando tecido normal); Escore 1 - discreta (infiltrado inflamatório discreto com predomínio de neutrófilos ou células mononucleares); Escore 2 - moderada (infiltrado inflamatório moderado adjacente ao material); Escore 3 - intensa (grande número de células inflamatórias determinando intenso infiltrado inflamatório junto à abertura dos

tubos); e Escore 4 - intensa com presença de abscesso (intenso infiltrado inflamatório e/ou abscesso junto à abertura dos tubos).

Fotomicrografias representativas de cada grupo experimental e controle foram obtidas utilizando-se um microscópio (Olympus BX51, Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica digital (Olympus CaMedia C5060 - ADU, Tokyo, Japão), com aumentos variando entre 40x e 400x.

2.3 Análise da expressão dos genes que codificam para as citocinas inflamatórias IL - 1 β e TNF- α

a Extração do RNA

Para a extração do RNA, as amostras congeladas em 1mL de Trizol (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) foram trituradas e homogeneizadas manualmente por 5 minutos em temperatura de bancada (15°C a 30°C). Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México) nos tubos, estes foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente (15°C a 30°C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas em microcentrifuga Eppendorf (Modelo 5415R, Hamburg, Alemanha) a 12.000 rcf, por 15 minutos, a 4°C, o que promoveu uma divisão da mistura em uma fase mais densa no fundo do tubo, a qual corresponde ao fenol/clorofórmio/DNA, uma interfase (proteína), e uma fase aquosa transparente superior, que corresponde à fase onde está o RNA, a qual foi transferida para um outro tubo de microcentrifuga. Nesse novo tubo, foi adicionado 0,5 mL de isopropanol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México) com a finalidade de precipitar o RNA da fase aquosa.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas manualmente, incubadas à temperatura ambiente (15°C a 30°C) por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 rcf, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* de RNA formado no fundo do tubo foi deixado secar, colocando-se o tubo em posição invertida sobre papel absorvente por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, o *pellet* foi lavado uma vez com 1mL de etanol 75% (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., Xalostoc, México). A amostra foi misturada em agitador de tubos (Phoenix Modelo AP-56, Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil) e centrifugada até 7500 rcf, por 5 minutos, a 4°C. Então, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi seco, mantendo-se o tubo em posição invertida sobre um papel absorvente por 30 a 40 minutos. O RNA foi redissolvido em 40 µL de água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) (BioAgency Laboratórios, São Paulo, Brasil) por meio de “up & down” com pipeta. Na sequência, as amostras foram incubadas a 55°C, por 10 minutos (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Alemanha), e transferidas imediatamente para o gelo.

Uma alíquota de RNA total (1 µL) foi diluída em água ultrapura tratada com DEPC, na proporção de 1:50, para a realização da quantificação do RNA utilizando-se biofotômetro (Eppendorf BioPhotometer modelo RS-232C, Hamburg, Alemanha), sendo considerada adequada a razão entre 1,8 e 2,0.

b RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da polimerase em cadeia)

Síntese do cDNA

Para cada uma das amostras de RNA total, foi sintetizado o cDNA (DNA complementar obtido a partir de uma alíquota de mRNA) por meio da reação de RT-PCR. Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram adicionados 1 µL de Oligo dT 100mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1µg de RNA total extraído, 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura tratada com DEPC para completar o volume total de 13 µL de solução. A solução foi incubada a 65°C, por 5 minutos, e, depois, transferida imediatamente para o gelo. Após um “spin” em microcentrífuga, foram adicionados 4 µL de tampão First-Strand 5x (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 2 µL de Ditioneitol (DTT 0,1 M) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A solução foi incubada a 42°C, por 2 minutos e, então, foi adicionado 1 µL (200 UI) da enzima Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A solução foi homogeneizada delicadamente com o auxílio de uma pipeta e incubada a 42°C, por 50 minutos. Após esse período de incubação, a reação foi inativada a 70°C, por 15 minutos.

PCR

Após a síntese do cDNA, foi analisada a expressão dos genes que codificam as citocinas IL-1β e TNF-α. Para cada um desses genes, foram desenhados *primers* específicos a partir da sequência de mRNA (Tabela 2).

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram adicionados 1µL do cDNA, 2,5 µL de Tampão Taq DNA polimerase 10x (Invitrogen, Carlsbad, CA,

EUA), 0,75 μL de MgCl_2 50mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 μL de dNTP 10mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,25 μL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 19,0 μL de água ultrapura tratada com DEPC, 0,5 μL do *primer forward* e 0,5 μL do *primer reverse* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O tubo foi transferido para um termociclador (ICYCLER™ Thermal Cycler, Biorad, EUA) e submetido à seguinte ciclagem térmica para amplificação: desnaturação inicial a 94°C, por 2 minutos, seguido de 55 ciclos com desnaturação a 94°C, por 30 segundos, hibridização do *primer* a 55°C, por 30 segundos, e extensão a 72°C, por 1 minuto. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose a 1,5% na presença de solução de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em cuba eletroforética operando a 80 mV, por 1 hora (Model MGU – 502T, C.B.S. Scientific Company, Del Mar, Califórnia, EUA), incluindo em cada gel um padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O controle endógeno utilizado foi o produto de PCR do gene constitutivo que codifica para β -actina. A visualização bem como a documentação fotográfica dos produtos amplificados foram realizadas por meio de um sistema de fotodocumentação (GDS 8000 System, UVP Laboratory Products, Upland, Califórnia, EUA).

Tabela 2 – Sequências e aplicações dos *primers* para *Rattus norvegicus* utilizados neste trabalho

Primer	Seqüências dos primers	Aplicação
<i>Forward</i>	5'-TGGAGAGTGTGGATCCCAA-3'	Amplificação de IL-1 β
<i>Reverse</i>	5'-CCGACCATTGCTGTTTCC-3'	
<i>Forward</i>	5'-GAGAAGAGGCTGAGGCACAG-3'	Amplificação de TNF α
<i>Reverse</i>	5'-CAGCAACTCCAGAACCCT-3'	
<i>Forward</i>	5'-CAGTTGGTGACAATGCCGT-3'	Amplificação de β -actina
<i>Reverse</i>	5'-CACCAGTTCGCCATGGAT-3'	

Análise estatística

A análise da resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos aos implantes de tubos de polietileno preenchidos com os diferentes CIVs foi feita de forma descritiva. A intensidade do evento histológico “reação inflamatória” foi classificada em escores e comparada para os diferentes materiais e períodos de análise pela aplicação dos testes não-paramétricos de Kruskal Wallis e de Mann-Whitney, considerando-se o nível de significância de 5%.

A expressão dos genes que codificam para as citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α foi analisada de forma descritiva.

RESULTADO

1 Análise histológica

A distribuição dos espécimes com relação ao evento histológico “reação inflamatória” do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos em função do implante de tubos de polietileno contendo diferentes CIVs está apresentada na Tabela 3 e foi descrita para cada grupo separadamente.

Tabela 3 – Distribuição dos espécimes de acordo com o escore de reação inflamatória, grupo e período de análise

Grupo	Período (dias)	Reação inflamatória				
		Escore				
		0 ausente/não significante	1 discreta	2 moderada	3 intensa	4 intensa com abscesso
Vitrebond (VB)	7	0	1	3	2	0
	15	1	0	3	2	0
Fuji Lining LC (FL)	7	0	1	5	0	0
	15	2	3	1	0	0
Vitremer (VM)	7	0	0	6	0	0
	15	2	3	1	0	0
Fuji II LC (FII)	7	0	1	5	0	0
	15	0	5	1	0	0
Ketac Fil Plus (KF)	7	0	1	3	1	0
	15	1	2	2	0	0
Ketac Molar	7	0	0	4	1	0
Easymix (KM)	15	0	0	5	1	0
Guta-percha (GP)	7	0	0	4	2	0
	15	1	2	3	0	0

Grupo VB - Vitrebond

Aos 7 dias, três espécimes apresentaram reação inflamatória moderada com predomínio de células mononucleadas adjacentes ao material (Figura 1 A, B). Foram observados numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestionados, e não houve formação de cápsula definida no local (Figura 2 A, B). Em dois casos,

a reação inflamatória foi intensa e, em um caso, discreta com formação de cápsula delgada.

Aos 15 dias, a reação inflamatória moderada com predomínio de células mononucleadas manteve-se em três espécimes, porém, nesse período de observação, a reação inflamatória estava associada à cápsula reacional (Figura 3 A, B). Dois espécimes apresentaram reação inflamatória intensa com predomínio de células mononucleadas, em meio à cápsula relativamente ampla, onde foram observados numerosos vasos sanguíneos de variados diâmetros em proliferação (Figura 4 A, B). Um espécime desse grupo mostrou reação inflamatória não-significante com presença de cápsula delgada.

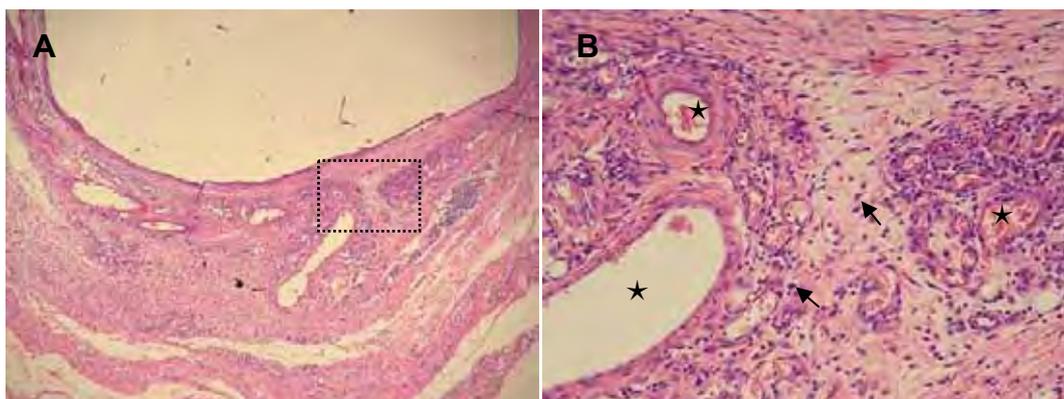


FIGURA 1 - Vitrebond – 7 dias. A - Vista geral da área adjacente à abertura do tubo. Tecido conjuntivo exhibe reação inflamatória moderada com predomínio de células mononucleadas e presença de grande número de vasos sanguíneos – H/E, 40x. B – Detalhe da área demarcada na figura anterior. Pode-se notar reação inflamatória mediada por células mononucleadas (setas) e presença de grande número de vasos sanguíneos dilatados e congestos (*), alguns dilatados. H/E, 200x.

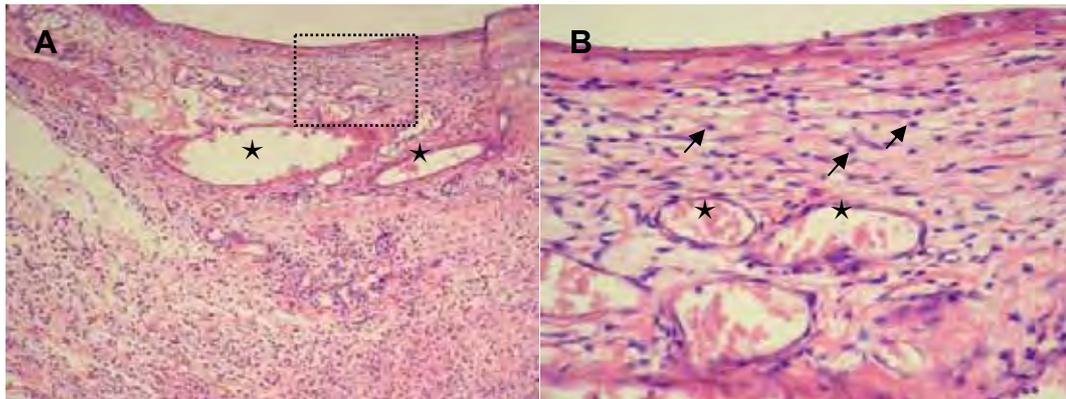


FIGURA 2 - Vitrebond - 7 dias. A – Reação inflamatória moderada do tecido conjuntivo, com presença de vasos sanguíneos dilatados e congestos (★) e ausência de cápsula definida no local. H/E, 100x. B - Detalhe da área demarcada na figura anterior, mostrando vasos sanguíneos dilatados e congestos (★) e moderado número de células mononucleadas (setas) em meio ao tecido conjuntivo próximo à área de contato com o material. H/E, 400x.

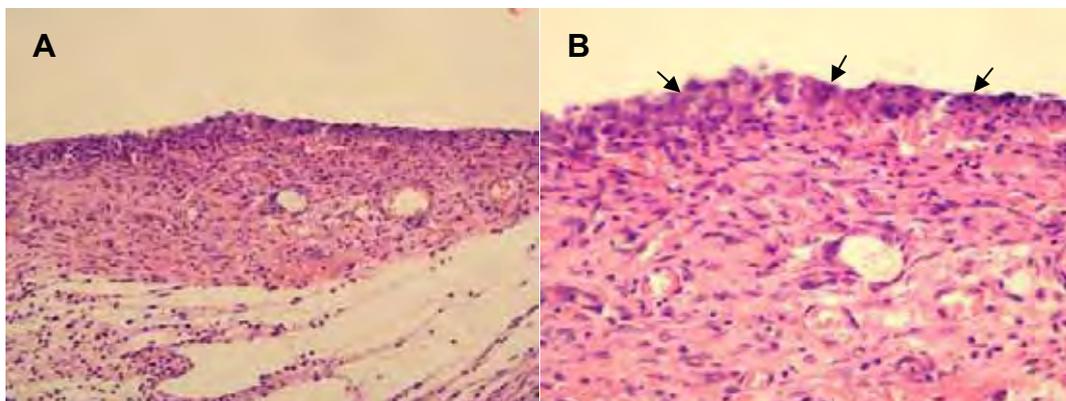


FIGURA 3 – Vitrebond - 15 dias. A - Presença de cápsula definida associada a reação inflamatória moderada e presença de grande número de vasos sanguíneos. H/E, 200x . B – Detalhe da figura anterior. Reação inflamatória moderada com predomínio de células mononucleadas e inúmeros vasos sanguíneos de pequeno diâmetro. Concentração de macrófagos e pequenas células gigantes imediatamente abaixo da abertura tubular (setas). H/E, 400x.

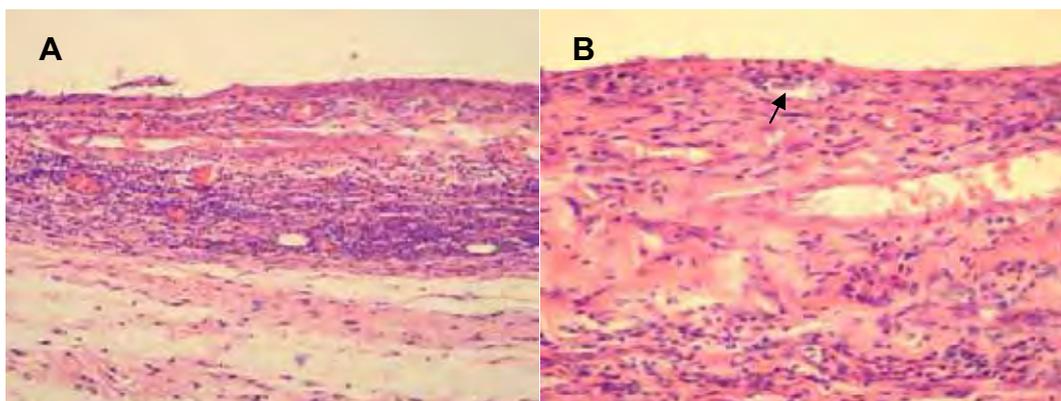


FIGURA 4 – Vitrebond – 15 dias. A – Presença de cápsula ampla associada a reação inflamatória intensa. H/E, 200x . B – Detalhe de outra região da mesma lâmina, evidenciando presença de células inflamatórias mononucleadas em meio a vasos sanguíneos de variados diâmetros. Resíduo de material pode ser observado no tecido (seta). Tendência de organização dos fibroblastos e colágeno em paralelo com relação à abertura do tubo. H/E, 400x.

Grupo FL - Fuji Lining LC

Aos 7 dias, cinco espécimes mostraram reação inflamatória moderada, com predomínio de células mononucleadas, e presença de alguns macrófagos associados à cápsula delgada formada junto à abertura do tubo (Figura 5 A, B). Em um espécime, a reação inflamatória foi discreta (Figura 6 A e B).

No período de 15 dias, dois espécimes apresentaram reação inflamatória não-significante, com grande quantidade de fibroblastos organizados, caracterizando o reparo quase completo (Figura 7 A, B). Adjacentes à cápsula, foram observadas esparsas células mononucleadas em meio a poucos vasos sanguíneos. Em um desses espécimes, foram observadas poucas células gigantes envolvendo pequena quantidade de fragmentos de material dispersos em meio ao tecido (Figura 7 B). Três espécimes apresentaram reação inflamatória discreta, com presença de poucas células inflamatórias e vasos sanguíneos pequenos e ingurgitados em meio à cápsula fibrosa delgada

continua àquela da superfície lateral do tubo (Figura 8). Apenas um espécime manteve a reação inflamatória moderada.

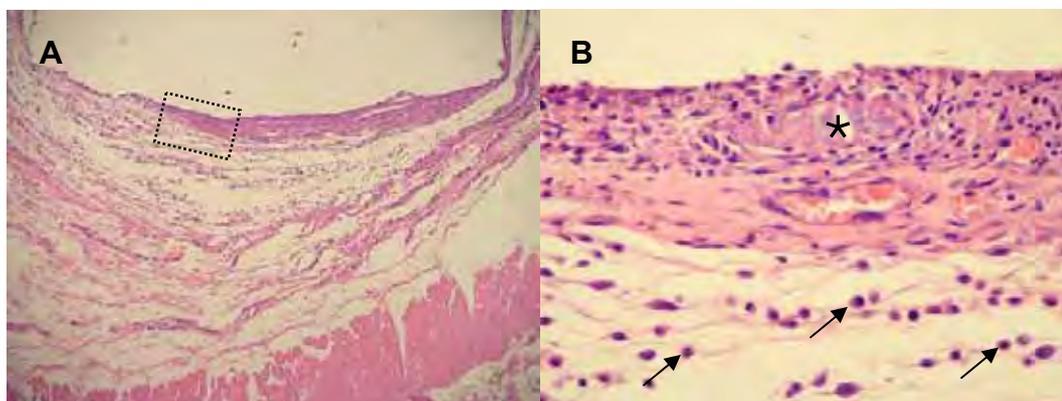


FIGURA 5 – Fuji Lining LC - 7dias. A – Vista geral da área do tecido conjuntivo que permaneceu em contato com o material exibindo reação inflamatória moderada associada à formação de cápsula delgada. H/E, 40x. B – Detalhe da área demarcada na figura anterior. Presença de fragmento de material (★) envolvido por células fagocitárias mononucleadas, em meio à cápsula fibrosa. Tecido conjuntivo subjacente à cápsula exhibe poucas células inflamatórias mononucleadas (setas). H/E, 400x.

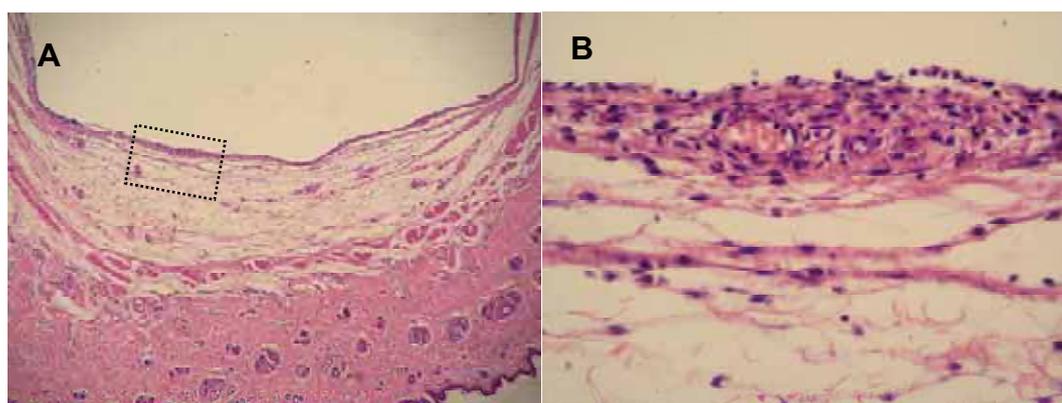


FIGURA 6 – Fuji Lining LC – 7 dias. A – Vista geral do tecido subjacente ao material implantado. Presença de cápsula fibrosa delgada em continuidade com aquela formada na lateral do tubo de polietileno. H/E, 40x. B – Detalhe da área demarcada na figura anterior mostrando cápsula delgada e presença de reação inflamatória discreta adjacente ao material implantado. H/E, 400x.

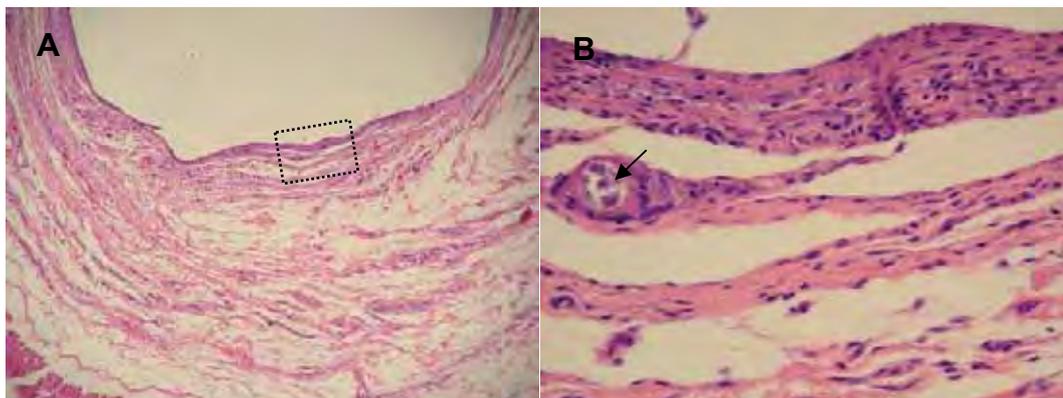


FIGURA 7 – Fuji Lining LC – 15 dias. A – Vista geral da área tecidual em contato com o material implantado, na qual observa-se presença de cápsula delgada em continuidade àquela formada na lateral do tubo. H/E, 40x . B - Detalhe da área demarcada na figura anterior, mostrando grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas organizados e presença de esparsas células inflamatórias mononucleadas caracterizando o reparo tecidual quase completo. Presença de célula gigante envolvendo pequeno fragmento de material disperso (seta). H/E, 400x.

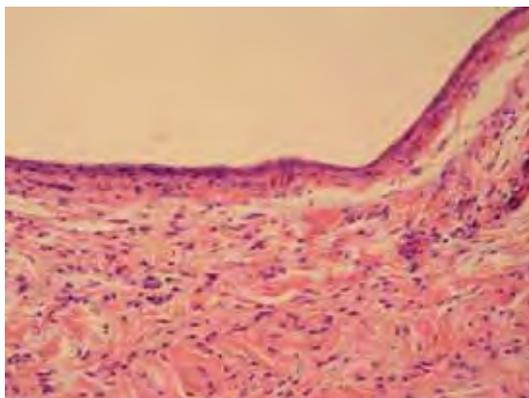


FIGURA 8 – Fuji Lining LC – 15 dias. Reação inflamatória discreta em meio à cápsula fibrosa delgada, que tem continuidade naquela formada na lateral do tubo de polietileno. H/E, 200x.

Grupo VM - Vitremer

No período de 7 dias, os seis espécimes apresentaram reação inflamatória moderada, com predomínio de células mononucleadas (linfócitos e macrófagos) e numerosos vasos sanguíneos congestionados e de variados diâmetros (Figura 9 A, B). Em contato com o material, foram observadas algumas células gigantes (Figura 10). Em dois espécimes, a cápsula fibrosa mostrou-se espessa e, nos demais, não houve formação de cápsula definida no local.

Aos 15 dias, o material determinou inflamação moderada em um espécime, que apresentava cápsula fibrosa relativamente delgada. Três espécimes mostraram inflamação discreta, com poucas células mononucleadas em meio a uma cápsula fibrosa delgada (Figura 11 A, B), na maior extensão da área de análise, porém dois deles apresentaram pequena quantidade de fragmentos de material dispersos em meio ao tecido, com uma reação moderada localizada, de padrão mononuclear, e com algumas células gigantes presentes. Dois espécimes apresentaram inflamação em grau não-significativo, caracterizando reparação tecidual quase completa.

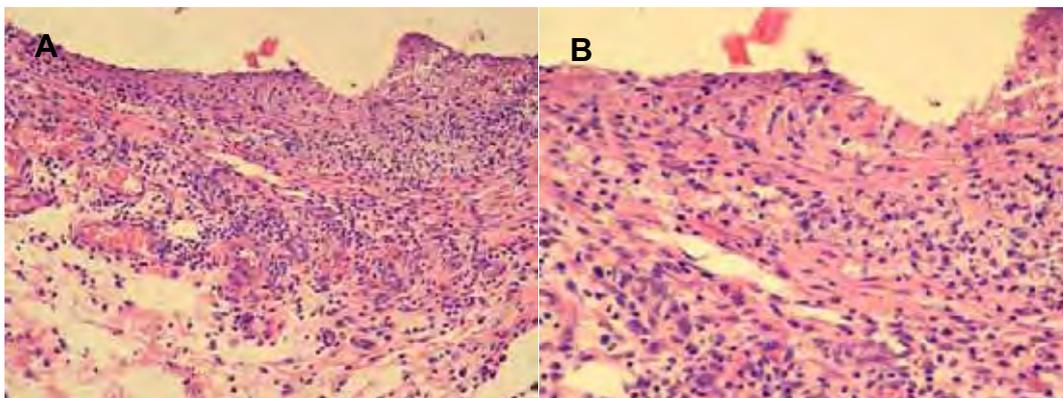


FIGURA 9 – Vitremer – 7 dias. A – Reação inflamatória moderada, com predomínio de células inflamatórias mononucleadas e presença de numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestionados. H/E, 200x. B – Detalhe da figura anterior evidenciando a reação inflamatória, com predomínio de células mononucleadas, na sua maioria linfócitos e macrófagos. H/E, 400x

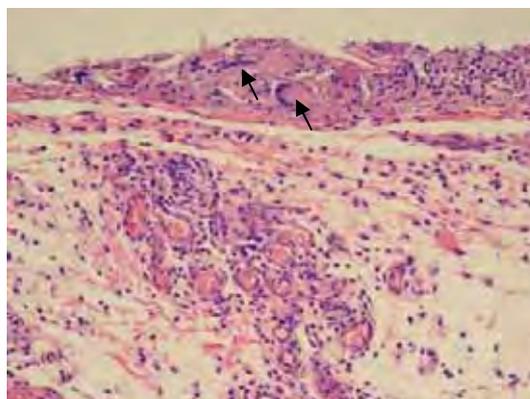


FIGURA 10 – Vitremer – 7 dias. Presença de reação inflamatória moderada do tecido conjuntivo, com ausência de formação de cápsula definida no local, presença de grande número de vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas (setas) em contato com o material. H/E, 400x.

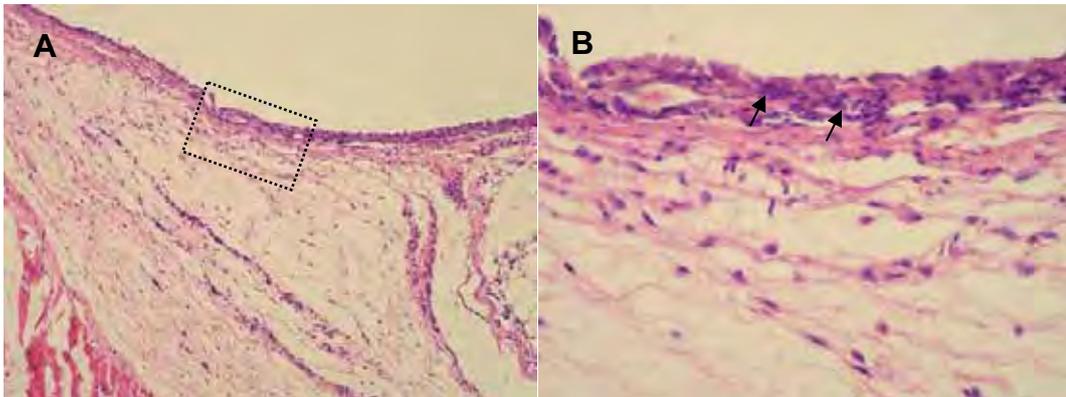


FIGURA 11 – Vitremer – 15 dias. A – Cápsula fibrosa delgada em contato com a área correspondente ao material implantado. Presença de reação inflamatória discreta. H/E, 100x . B – Detalhe da região demarcada na figura anterior, mostrando discreto número células inflamatórias mononucleadas junto à abertura do tubo (setas). H/E, 400x.

Grupo FII - Fuji II LC

Aos 7 dias, cinco espécimes apresentaram cápsula espessa e reação inflamatória moderada, com predomínio de células mononucleadas (linfócitos) e numerosos vasos sanguíneos congestos de variados diâmetros (Figura 12 A, B). Em dois destes espécimes, foram observados amplos fragmentos de material em meio à cápsula reacional (Figura 13 A, B). Um espécime apresentou reação inflamatória discreta e cápsula fibrosa delgada.

No período de 15 dias, cinco espécimes apresentaram reação inflamatória discreta com poucas células mononucleadas adjacentes à cápsula fibrosa delgada contínua àquela formada na superfície lateral do tubo de polietileno (Figura 14 A, B). Um espécime apresentou reação inflamatória moderada com predomínio de células mononucleadas e pequena quantidade de células gigantes adjacente ao material.

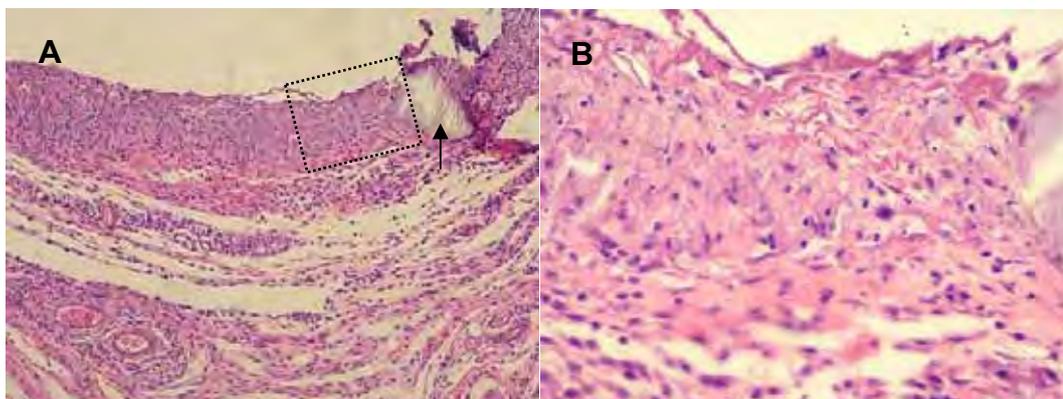


FIGURA 12 - Fuji II LC – 7 dias. A - Presença de cápsula espessa com reação inflamatória de grau moderado, adjacente à área onde estava o material. Amplo fragmento de cimento de ionômero de vidro em meio ao tecido reacional (seta). H/E, 100x . B – Detalhe da área demarcada na figura anterior, evidenciando infiltrado inflamatório mononuclear junto à abertura do tubo de polietileno. H/E, 400x.

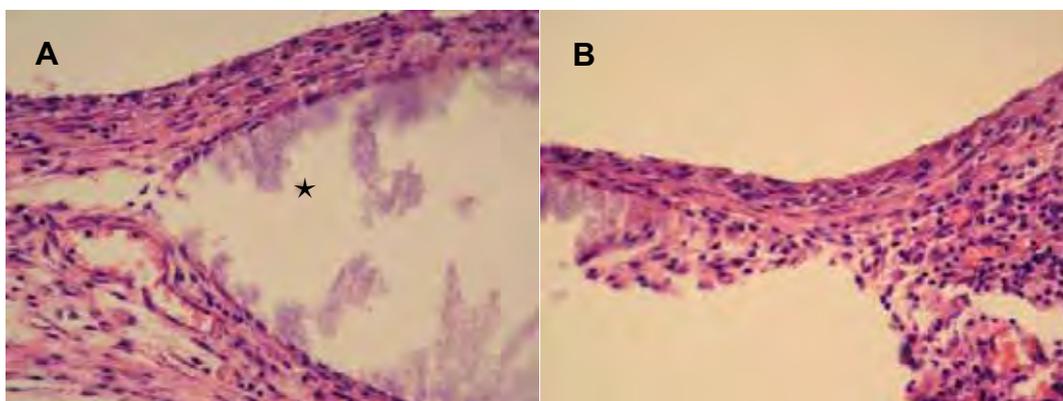


FIGURA 13 - Fuji II LC – 7 dias. A - Presença de fragmento de material em meio à cápsula reacional (★). H/E, 400x . B - Detalhe da extremidade oposta àquela vista em A, evidenciando moderado número de células inflamatórias e presença de pequenos vasos sanguíneos congestionados. H/E, 400x.

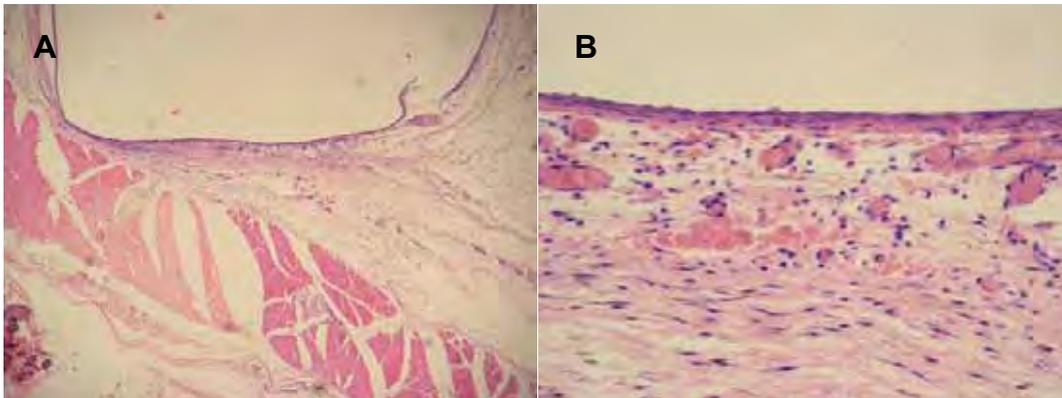


FIGURA 14 – Fuji II LC – 15 dias. A – Vista geral da área do implante, mostrando cápsula fibrosa delgada em continuidade com aquela formada na superfície lateral do tubo de polietileno. Tecido subjacente com características histológicas de normalidade. H/E, 40x. B – Maior aumento da Figura A, evidenciando presença de cápsula fibrosa delgada com poucas células inflamatórias mononucleadas e vasos sanguíneos adjacentes. H/E, 400x.

Grupo KF - Ketac Fil Plus

Aos 7 dias, três espécimes apresentaram reação inflamatória moderada (Figura 15 A, B). Em apenas um espécime deste grupo, ocorreu reação inflamatória intensa com ampla formação de tecido de granulação rico em vasos sanguíneos, macrófagos e linfócitos (Figura 16 A, B). Nesse espécime, algumas áreas localizadas exibiram infiltrado neutrofílico associado a fragmentos do material dispersos em meio ao tecido reacional, com presença de macrófagos e células gigantes (Figura 16 B). Dos dois espécimes restantes, um apresentou reação inflamatória discreta associada a delgada cápsula fibrosa, e o outro foi eliminado das análises por apresentar intensa reação neutrofílica, inclusive em contato com as paredes laterais do tubo de polietileno, sugerindo a presença de contaminação.

No pós-operatório de 15 dias, dois espécimes mostraram inflamação moderada em meio a uma relativamente ampla cápsula formada junto à abertura do tubo, com grande quantidade de células inflamatórias, principalmente macrófagos, em contato com o material. Dois espécimes apresentaram reação inflamatória discreta com predomínio de células mononucleadas em meio a uma cápsula ligeiramente espessa (Figura 17 A, B). Um espécime desse grupo apresentou reação inflamatória não-significante, com uma pequena área adjacente à cápsula delgada e fibrosa apresentando leve reação inflamatória, com predomínio de macrófagos e linfócitos ao redor de fragmentos de material (Figura 18 A, B). Um espécime foi perdido no processamento histológico.

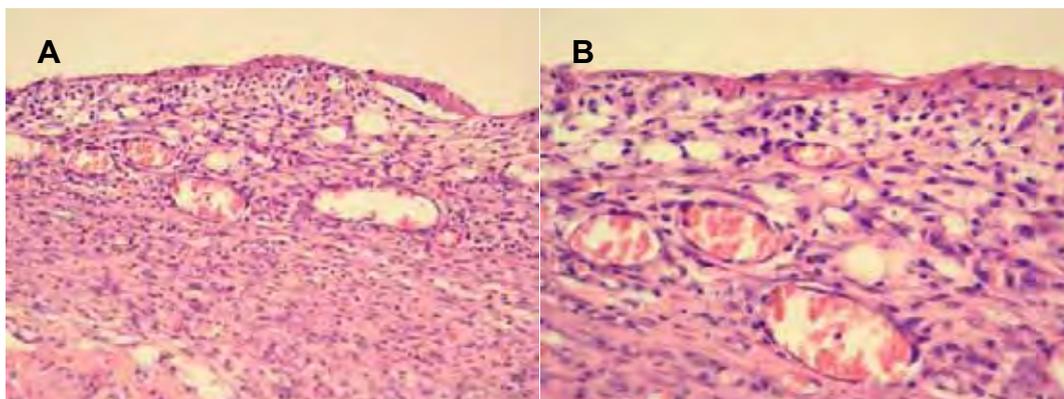


FIGURA 15 – Ketac Fil Plus – 7 dias. A - Área em contato com o material evidenciando presença de reação inflamatória moderada, com muitos vasos sanguíneos de diferentes diâmetros. H/E, 200x. B – Detalhe da figura anterior, evidenciando o predomínio de células inflamatórias mononucleadas e vasos sanguíneos dilatados e congestos. H/E, 400x.

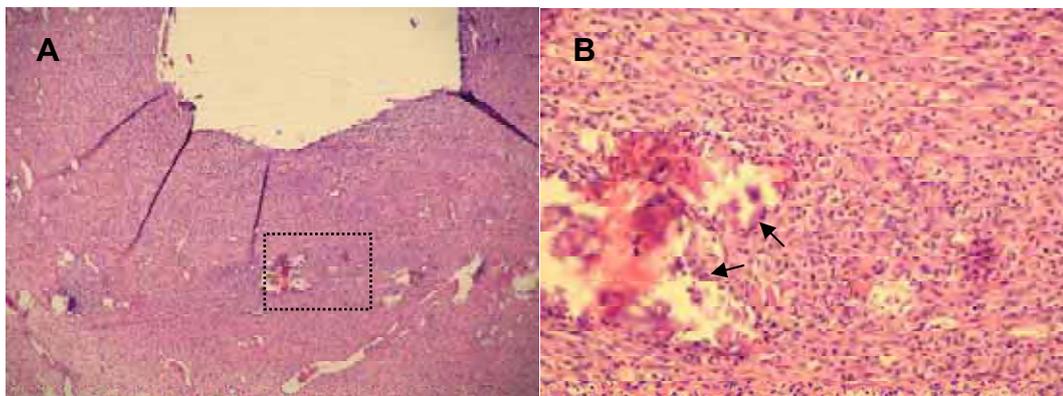


FIGURA 16 – Ketac Fil Plus – 7 dias. A – Vista geral da região do implante mostrando reação inflamatória intensa com presença de inúmeros vasos sanguíneos e fragmentos de material deslocados para o interior do tecido. H/E, 40x. B – Maior aumento da região demarcada na figura anterior, mostrando reação inflamatória caracterizada por células mononucleadas, principalmente macrófagos e linfócitos, bem como algumas células gigantes em torno das partículas de material (setas). H/E, 200x.

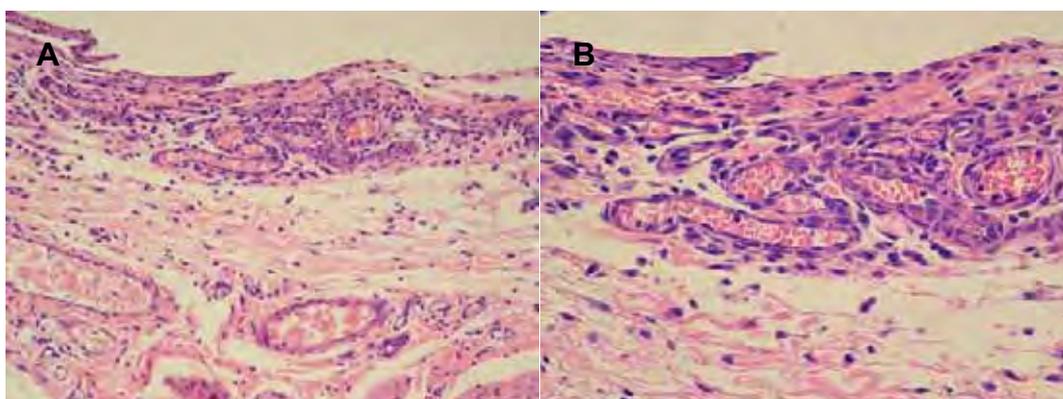


FIGURA 17 - Ketac Fil Plus - 15 dias. A – Presença de reação inflamatória discreta e grande número de vasos sanguíneos em meio à cápsula ligeiramente espessa. H/E, 200x . B – Detalhe da cápsula evidenciando o predomínio de células inflamatórias mononucleadas e inúmeros vasos sanguíneos congestionados e de variados diâmetros. H/E, 400x.

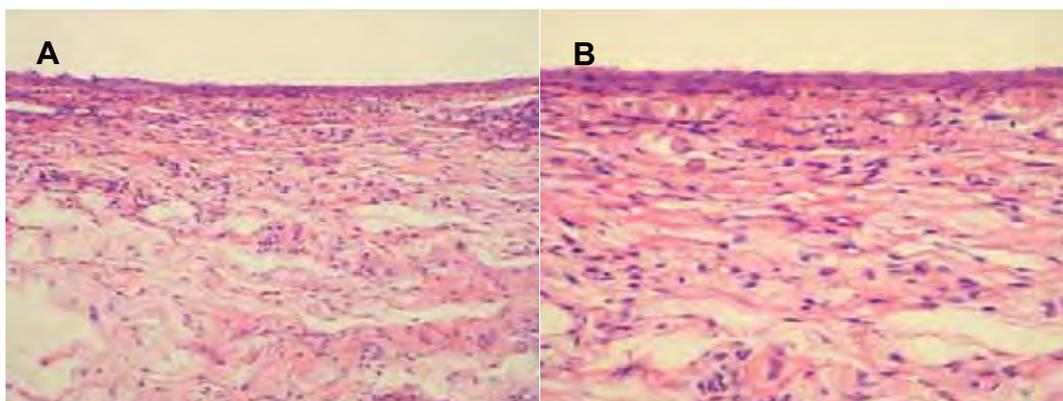


FIGURA 18 - Ketac Fil Plus - 15 dias. A – Presença de cápsula fibrosa delgada superficial e reação inflamatória não-significativa. H/E, 200x. B – Detalhe da figura anterior, mostrando área adjacente à cápsula fibrosa, com inflamação leve e predomínio de macrófagos e linfócitos. H/E, 400x.

Grupo KM – Ketac Molar Easymix

Aos 7 dias, quatro espécimes apresentaram reação inflamatória moderada com predomínio de células mononucleadas e numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos (Figura 19 A, B). Um espécime mostrou reação intensa associada à presença de resíduos de material em meio à cápsula reacional. Um espécime deste grupo foi perdido durante o processamento para análise histológica.

No período de 15 dias, cinco espécimes apresentaram reação inflamatória moderada, caracterizando uma cápsula relativamente espessa, com presença de macrófagos adjacentes a resíduos de material próximos à abertura do tubo (Figura 20 A, B). Um espécime apresentou reação inflamatória severa com predomínio de linfócitos e macrófagos em toda a cápsula, que se apresentou ampla. Porém, uma maior quantidade de macrófagos foi observada na parte interna da cápsula em contato com o material.

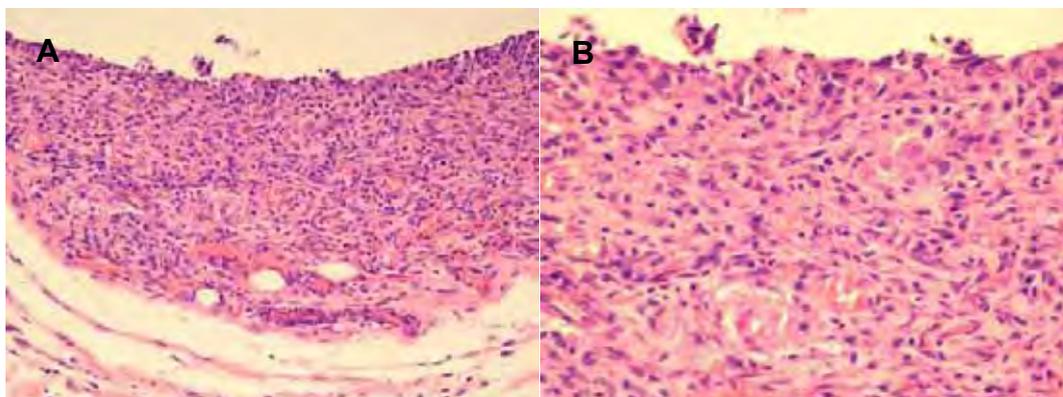


FIGURA 19 - Ketac Molar Easymix - 7 dias. A – Cápsula reacional definida, onde pode ser observada reação inflamatória moderada com presença de grande número de vasos sanguíneos dilatados e congestos. H/E, 200x. B – Detalhe da Figura A, evidenciando predomínio de células inflamatórias mononucleadas no tecido conjuntivo adjacente ao material ionomérico implantado. H/E, 400x.

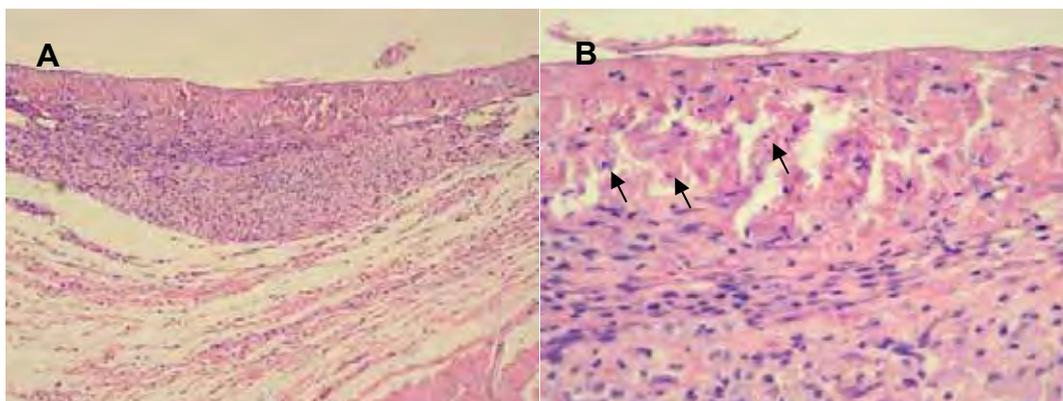


FIGURA 20 - Ketac Molar Easymix - 15 dias. A – Presença de reação inflamatória moderada caracterizando cápsula relativamente espessa. H/E, 100x. B – Detalhe da figura anterior mostrando a presença de macrófagos adjacentes às partículas de material (setas). H/E, 400x.

Grupo GP - Guta-percha

Neste grupo, aos 7 dias de pós-operatório, quatro espécimes apresentaram reação inflamatória moderada, com presença de espessa cápsula reacional (Figura 21 A, B). Dois espécimes mostraram reação inflamatória intensa associada à ampla cápsula fibrosa com numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestionados, tendo um destes espécimes apresentado grande quantidade de fragmentos de material em meio à ampla cápsula reacional.

Aos 15 dias, três espécimes mostraram persistência da reação inflamatória moderada em meio à cápsula relativamente delgada (Figura 22 A, B). Dois espécimes apresentaram reação inflamatória discreta, com cápsula delgada e presença de macrófagos na sua face interna em íntima relação com o material (Figura 23 A, B). Um espécime apresentou reação não-significante, porém com células gigantes envolvendo uma pequena quantidade de fragmentos de material dispersos.

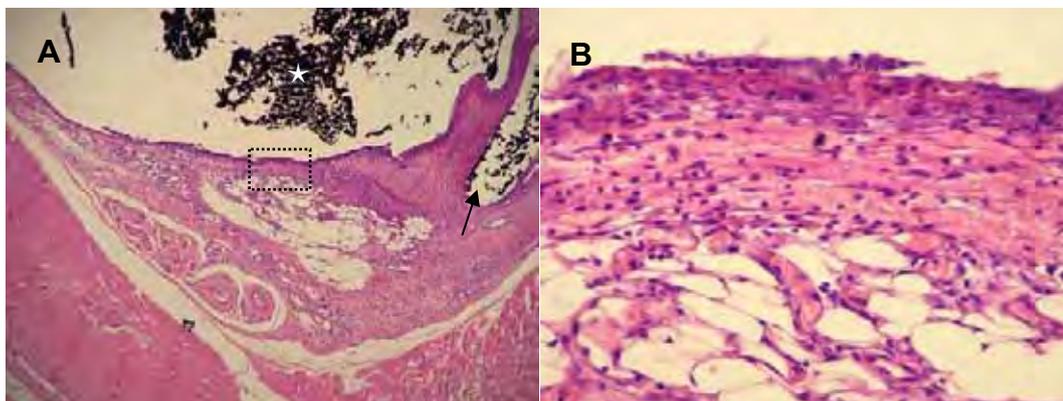


FIGURA 21 – Guta-percha - 7 dias. A – Vista geral da área do implante, onde se observa presença do material no interior do tubo (estrela branca), bem como resíduos extravasados em meio ao tecido reacional (seta). H/E, 40x. B – Detalhe da região demarcada na figura anterior, onde se pode visualizar a reação inflamatória moderada com presença de macrófagos adjacentes ao implante. H/E, 400x.

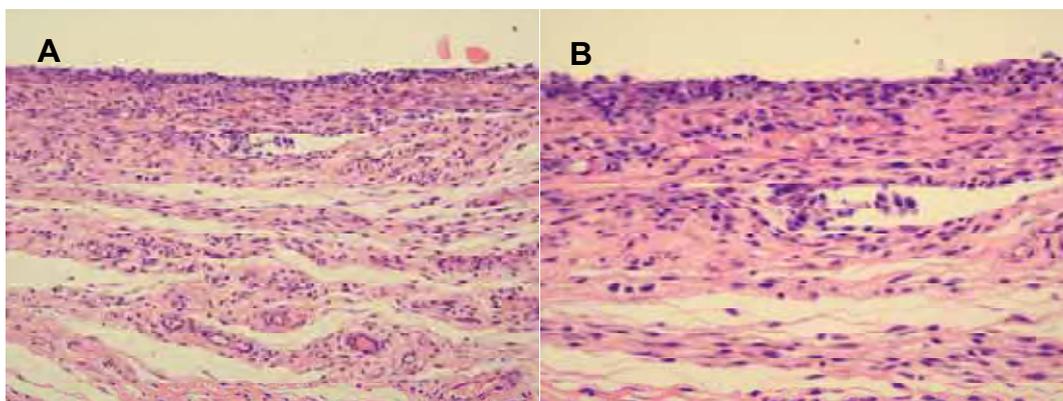


FIGURA 22 - Guta-percha - 15 dias. A – Presença de reação inflamatória moderada e cápsula relativamente delgada. H/E, 200x. B – Detalhe da cápsula, mostrando moderado número de células inflamatórias mononucleadas e vasos sanguíneos de pequeno diâmetro. Tendência à organização de fibroblastos e fibras colágenas em paralelo com relação à abertura do tubo. H/E, 400x.

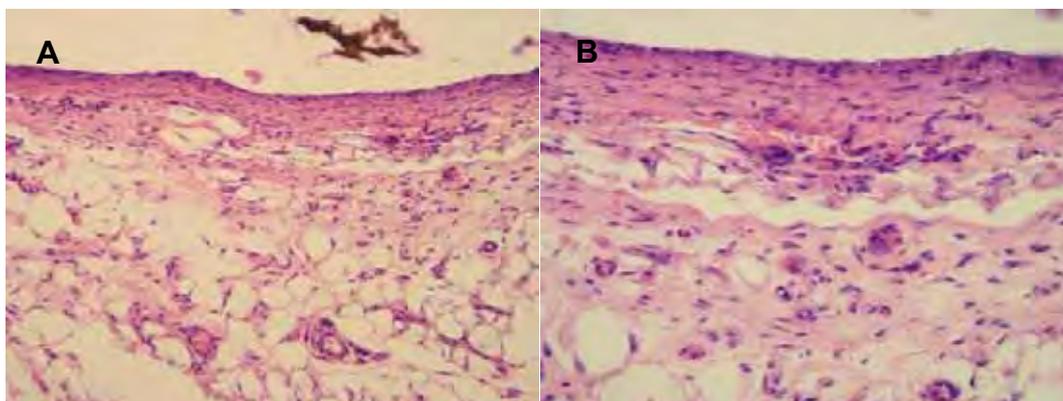


FIGURA 23 - Guta-percha - 15 dias. A – Presença de reação inflamatória discreta em meio à cápsula delgada. H/E, 200x . B – Detalhe da figura anterior mostrando cápsula fibrosa com presença de poucos macrófagos próximos à superfície em contato com o material. Tecido conjuntivo subjacente com características de normalidade. H/E, 400x.

A análise realizada por meio da aplicação do teste de Kruskal-Wallis mostrou a ausência de diferença estatística, com relação à resposta inflamatória, entre os diferentes materiais no período de 7 dias ($p>0,05$). No período de 15 dias, o Ketac Molar Easymix apresentou reação inflamatória moderada, estatisticamente maior do que os demais materiais (Mann-Whitney, $p<0,05$), com exceção do Vitrebond. Comparando os períodos de 7 e 15 dias de pós-operatório, observou-se uma redução significativa na resposta inflamatória para os materiais Fuji Lining LC, Vitremer, Fuji II LC e para a guta-percha (grupo controle) (Mann-Whitney, $p<0,05$). Para os cimentos Vitrebond, Ketac Fil Plus e Ketac Molar Easymix, não houve diferença entre os dois períodos de avaliação (Mann-Whitney, $p>0,05$), (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação comparativa dos escores da reação inflamatória (mediana, P25-P75), de acordo com os materiais e períodos de avaliação

Material		Reação Inflamatória	
		Período de Análise	
		7 dias	15 dias
CIVs modificados por resina para forramento/base	Vitrebond	2 (2-3) a A	2 (2-3) ab A
	Fuji Lining LC	2 (2-2) a A	1 (0-1) b B
CIVs modificados por resina restauradores	Vitremer	2 (2-2) a A	1(0-1) b B
	Fuji II LC	2 (2-2) a A	1(1-1) b B
CIVs convencionais restauradores	Ketac Fil Plus	2 (2-3) a A	1(1-2) b A
	Ketac Molar Easymix	2 (2-3) a A	2 (2-2) a A
Guta-percha (controle negativo)		2 (2-3) a A	2 (1-2) b B

Letras minúsculas iguais nas colunas e letras maiúsculas iguais na linhas denotam ausência de diferença estatística (Mann-Whitney, $p>0,05$).

2 Análise da expressão dos genes que codificam para as citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α

A análise das bandas eletroforéticas obtidas como resultado da reação de RT-PCR mostrou que todos os materiais estudados induziram a expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α , nos períodos de 7 e 15 dias de pós-operatório. Entretanto, aos 7 dias, as bandas referentes a IL-1 β apresentaram maior intensidade do que aquelas referentes ao TNF- α , sugerindo que, nesse período, existe maior expressão da IL-1 β (Figura 24).

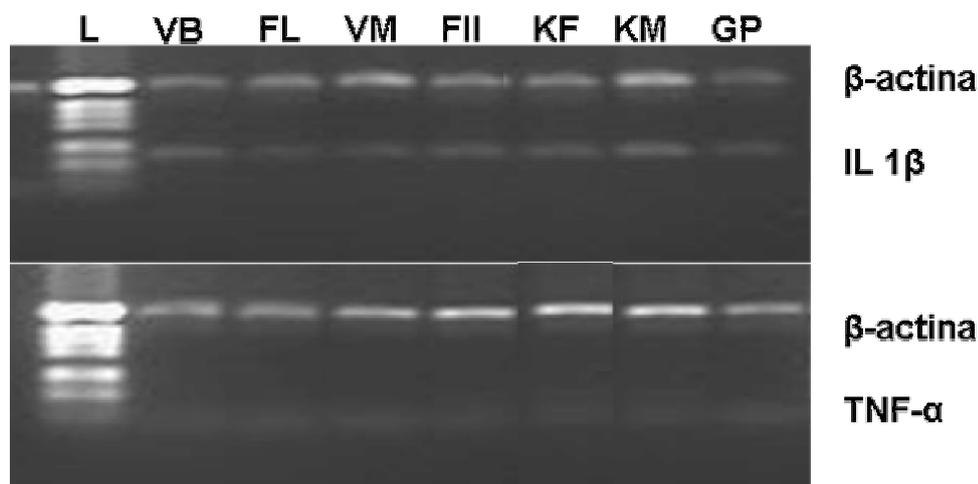


FIGURA 24 – Expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α analisados utilizando-se RT-PCR nos grupos experimentais e controle aos 7 dias de pós-operatório.

No período de 15 dias, as bandas correspondentes ao TNF- α apresentaram maior intensidade, denotando uma maior expressão dos genes que codificam para essa citocina nesse período de avaliação (Figura 25). O CIV

modificado por resina Fuji Lining LC foi o material que induziu a menor expressão de TNF- α no período de 15 dias.

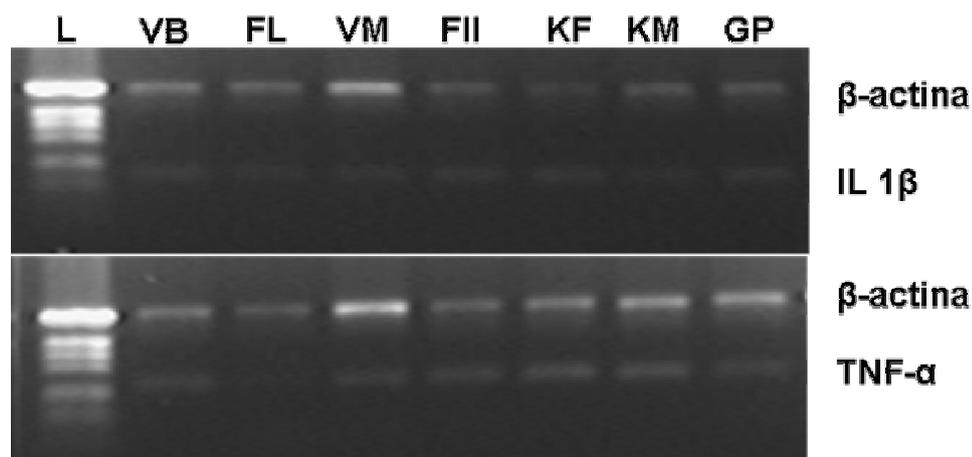


FIGURA 25 – Expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α analisados utilizando-se RT-PCR nos grupos experimentais e controle aos 15 dias de pós-operatório.

DISCUSSÃO

Os testes recomendados pela ISO²²⁻²⁴ para avaliar a biocompatibilidade de materiais odontológicos incluem as análises de citotoxicidade *in vitro*^{1,3,5,18,48,51}, as reações de toxicidade local pelo implante subcutâneo dos materiais em animais de laboratório^{39,47,51} e os testes de aplicação pré-clínica em animais^{7,9,12,14,36,53} e em humanos^{36,37,49,50}. Embora os métodos utilizando cultura de células forneçam informações importantes sobre a resposta de células específicas aos materiais testados, eles apresentam algumas limitações para mostrar o quadro completo de reação tecidual ao material²⁵. Assim, os

experimentos utilizando implantes in vivo apresentam maior relevância clínica com relação à resposta tecidual em diferentes períodos de observação².

Na presente pesquisa, foi realizado o teste de implantação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, utilizando, para isso, tubos de polietileno preenchidos com diferentes CIVs. A avaliação foi realizada na área correspondente à extremidade aberta do tubo, na qual o tecido conjuntivo permaneceu em contato direto com os materiais, sendo considerados, para a análise, a intensidade da reação inflamatória, bem como o tipo de células envolvidas. A inflamação é considerada um importante critério na avaliação da biocompatibilidade, a qual na primeira semana após o implante subcutâneo, geralmente é mais intensa porque, somado ao potencial de agressão próprio de cada material, existe, também, o trauma produzido durante o ato cirúrgico para implantação dos tubos de polietileno^{47,51}. A reação inflamatória aos 7 dias de pós-operatório foi classificada, no presente estudo, como sendo de grau moderado e não houve diferença estatística entre os diferentes materiais implantados. Aos 15 dias, os CIVs Fuji Lining LC, Vitremer, Fuji II LC e Ketac Fil Plus mostraram inflamação discreta, enquanto o Vitrebond e o Ketac Molar Easymix mantiveram uma inflamação moderada, sugerindo um maior potencial de agressão aos tecidos vivos.

A guta-percha foi usada como grupo controle por ser considerada de baixo grau de citotoxicidade⁴⁶, determinando pouca ou nenhuma inflamação in vivo^{33,57}. Entretanto, neste trabalho, a guta-percha provocou, aos 7 dias, reação inflamatória de graus moderado e intenso associada à presença de cápsula reacional espessa, resposta inflamatória esta que diminuiu de forma significativa aos 15 dias de pós-operatório ($p < 0,05$), apresentando-se de graus leve e

moderado, com presença de macrófagos em meio à cápsula fibrosa relativamente delgada em contato com o material. Bodrumlu et al.² (2008), usando a guta-percha, observaram, aos 7 dias, uma reação inflamatória severa com predomínio de células mononucleadas, macrófagos, células plasmáticas e células gigantes multinucleadas. Segundo esses autores, o grau de inflamação reduziu para moderado, com predomínio de células mononucleadas, aos 15 dias, e, apenas aos 60 dias de pós-operatório, a inflamação mostrou-se suave. De acordo com Pascon et al.⁴⁰ (1990), apenas a guta-percha pura apresenta-se absolutamente biocompatível. Entretanto, nas pontas comercializadas, a guta-percha pura representa apenas 20% da composição, sendo o óxido de zinco o principal componente adicionado ao material base²⁰. Assim, a citotoxicidade apresentada pela guta-percha em vários testes de sensibilidade in vitro e in vivo, inclusive no presente estudo, pode ser devida ao seu alto conteúdo de óxido de zinco, que, segundo Pascon et al.⁴⁰ (1990), é significativamente citotóxico.

Quando se avalia a biocompatibilidade de um material, os efeitos prejudiciais em longos períodos de observação são considerados mais importantes do que os efeitos iniciais. Assim, no presente estudo, que avaliou os materiais num período relativamente curto de tempo, pode-se sugerir que todos os CIVs foram biologicamente aceitáveis, observando-se que, para o Fuji Lining, o Vitremer e o Fuji II LC, houve uma redução estatisticamente significativa da intensidade da reação inflamatória, associada à presença de delgada cápsula fibrosa envolvendo os implantes. Para os CIVs Vitrebond, Ketac Fil Plus e Ketac Molar Easymix e para a guta-percha, embora não tenha ocorrido uma redução estatisticamente significativa da intensidade da reação inflamatória entre os períodos de 7 e 15 dias, alguns espécimes mostraram inflamação discreta, e a

cápsula fibrosa tendeu a ser menos espessa. Souza et al.⁵¹ (2006), avaliando os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina Vitrebond e Vitremer em subcutâneo de ratos, também mostraram redução da intensidade da reação com o tempo. Para ambos os materiais, a inflamação foi de grau moderado a intenso aos 7 dias, evoluindo para uma reação leve a moderada aos 30 dias e leve ou ausente aos 90 dias.

Apesar de estudos *in vitro* mostrarem que os CIVs modificados por resina apresentam maior citotoxicidade do que os CIVs convencionais^{21,26,30,38,48,52}, neste trabalho *in vivo* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre esses materiais aos 7 dias de avaliação. Aos 15 dias, os CIVs modificados por resina não apresentaram diferença estatística com relação à intensidade da reação inflamatória, independente de os materiais serem indicados para forramento/base ou para restauração. Essa categoria de materiais induziu, ainda, reação semelhante à do CIV convencional Ketac Fil Plus e à da guta-percha. Por outro lado, o CIV convencional Ketac Molar Easymix se mostrou como o material menos biocompatível nesse período de avaliação, sendo comparável apenas ao Vitrebond. Sugere-se que essa menor compatibilidade biológica possa ser devida às modificações na formulação desse CIV convencional, as quais foram feitas com o objetivo de melhorar a umectabilidade do pó pelo líquido e obter uma mistura mais rápida. Isso resultou em melhores propriedades físicas e mecânicas⁴², porém não foram encontrados estudos quanto à sua influência nas propriedades biológicas do material.

Além do trauma decorrente do ato cirúrgico para implantação dos tubos de polietileno contendo os materiais^{47,51}, fatores como a umidade, que aumenta a solubilização dos CIVs, bem como o baixo pH inicial desses cimentos^{56,58}

também podem causar efeito irritante imediato, determinando uma reação inflamatória mais intensa no período inicial de avaliação. Entretanto, em períodos mais longos, o fluido tecidual em contato com o material na abertura do tubo tem a capacidade de neutralizar os efeitos deletérios causados pelo pH, e os componentes liberados, principalmente os de baixo peso molecular, são removidos do local por drenagem linfática ou são fagocitados e digeridos pelas células de defesa⁴⁷. Assim, o tecido passa a ter condições favoráveis para que ocorra a reparação, o que indica uma aceitável biocompatibilidade desses materiais. No período de 15 dias, pode ser observada, para a maioria dos CIVs, uma redução na intensidade da reação inflamatória, porém, com o Ketac Molar Easymix e o Vitrebond, houve persistência de reação inflamatória moderada, com presença de macrófagos e algumas células gigantes adjacentes à abertura do tubo, o que denota seu maior poder de agressão aos tecidos vivos. Observou-se também, em alguns espécimes, fragmentos de material em meio à cápsula reacional espessa mantendo uma resposta inflamatória moderada localizada, pois esses fragmentos agem como corpo estranho. Outros estudos realizados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos mostraram achados histológicos semelhantes a esses, aos 30 dias de pós-operatório^{47,51}. Entretanto, em tempos de avaliação maiores, como 90 dias, a reparação total foi obtida.

A resposta biológica aos biomateriais está diretamente relacionada com a capacidade de o material alterar a viabilidade ou a função secretora celular^{44,45}. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , estudadas nesta pesquisa, são amplamente expressas por macrófagos nos estágios iniciais da inflamação e, em menor proporção, por outros tipos celulares, como os linfócitos e as células endoteliais. Embora sejam produtos de diferentes genes, compartilham muitas

propriedades biológicas, estando envolvidas com os eventos vasculares e celulares que ocorrem no processo inflamatório^{8,28}.

Embora a liberação de íons e/ou elementos atômicos inorgânicos e de monômeros orgânicos pelos CIVs convencionais e modificados por resina seja bastante estudada^{11,13,15,17,18,52}, pouco se sabe sobre a capacidade desses componentes de alterar a liberação de citocinas por macrófagos. Entretanto, segundo Wataha et al.⁵⁴ (1996), podem ocorrer alterações na liberação de citocinas (IL-1 β e TNF- α), uma vez que íons metálicos em concentrações sub-tóxicas, como aquelas liberadas por esses materiais, tem a capacidade de alterar a produção de proteínas em macrófagos. Monômeros resinosos residuais liberados de materiais odontológicos podem causar efeito inibitório sobre células imunocompetentes²⁵. Esses monômeros podem, ainda, alterar de forma dose-dependente a função de macrófagos, reduzindo a secreção de citocinas (IL-1 β e TNF- α)^{44,45}, e, ao mesmo tempo, estimular outras células que sinalizam para a proliferação de linfócitos e produção dessas citocinas²⁵.

As citocinas, além de estarem envolvidas com as alterações vasculares e celulares que ocorrem na reação inflamatória, apresentam, também, um efeito mitogênico e quimiotático sobre os fibroblastos aumentando a síntese tanto de colágeno como de colagenase, efeito esse importante na reorganização e remodelação do tecido conjuntivo durante o processo de reparo^{8,28,43}. Assim, componentes liberados de materiais odontológicos que têm o potencial de estimular excessivamente ou inibir a capacidade dos macrófagos de secretar mediadores inflamatórios representam um risco para o sucesso do reparo tecidual, que requer a função normal dessas células^{8,43}.

A intensidade das bandas eletroforéticas obtidas pela reação de RT-PCR para o período de 7 dias sugeriu que, todos os materiais estudados, induziram uma maior expressão inicial de IL-1 β em relação ao TNF- α . No período de 15 dias, houve uma redução da expressão de IL-1 β e um aumento da expressão de TNF- α . Esta ocorrência era esperada, uma vez que, no processo inflamatório, inicialmente é expressa a interleucina, que ativa os linfócitos estimulando a produção de mais interleucina e de outras citocinas⁸, entre as quais o fator de necrose tumoral. Os níveis desse aumentam na área da ferida quando se inicia o processo de reparação, ou seja, no final da fase proliferativa e início da fase de maturação, que coincidem com o período de síntese dos fibroblastos e de proliferação de células endoteliais²⁸.

A capacidade dos componentes liberados pelos materiais de alterar a função celular, neste estudo, foi coincidente com a reação inflamatória avaliada histologicamente. O Fuji Lining LC, no período pós-operatório de 15 dias, induziu uma pequena expressão dos genes que codificam para TNF- α e, na análise histológica, observou-se cápsula fibrosa delgada praticamente livre de células inflamatórias envolvendo o material implantado. Esses resultados apontaram o Fuji Lining LC como um dos materiais mais biocompatíveis entre os estudados, com significativa redução da reação inflamatória e reparo quase completo num curto período de avaliação.

Os resultados deste estudo são relevantes, uma vez que os CIVs estudados são colocados em contato direto com a dentina, que é um substrato semipermeável, e que, dependendo da espessura remanescente no assoalho da cavidade, a difusão de componentes desses materiais pode afetar o

comportamento do tecido pulpar e, conseqüentemente, o comportamento clínico das restaurações.

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais deste trabalho, pode-se concluir que:

1 – de forma geral, os CIVs estudados apresentaram compatibilidade biológica aceitável em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, embora para o Ketac Molar Easymix e o Vitrebond a reação inflamatória tenha persistido até 15 dias de pós-operatório;

2 – todos os CIVs induziram a expressão dos genes que codificam para IL-1 β e TNF- α , porém aos 15 dias, a intensidade da expressão de TNF- α induzida pelo Fuji Lining LC foi menor do que aquela observada para os outros CIVs.

REFERÊNCIAS

1. Aranha AMF, Giro EMA, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to na odontoblast-cell line. Dent Mat. 2006; 22: 864-9.
2. Bodrumlu E, Muglali M, Sumer M, Guvenc T. The response of subcutaneous connective tissue to a new endodontic filling material. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 2008; 84B: 463-7.
3. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciuchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. J Endod. 1996; 22: 244-8.

4. Bullard RH, Leinfelder KF, Russell CM. Effect of coefficient of thermal expansion on microleakage. *J Am Dent Assoc.* 1998; 116: 871-4.
5. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for assessment of cytotoxicity of composite resins. *J Appl Toxocol.* 2005, 25:101-8.
6. Cho E, Kopel H, White SN. Moisture susceptibility of resin-modified glass-ionomer materials. *Quintessence Int.* 1995; 26: 351-8.
7. Costa CAS, Oliveira MF, Giro EMA, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials as pulp-capping agents. *Int Endod J.* 2003; 36: 831-9.
8. Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 1988; 2: 108-15.
9. Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EMA, Oliveira MF, de Souza Costa CA. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in non human primate teeth. *J Oral Rehabil.* 2006, 33: 452-61.
10. Erickson RL, Glasspoole EA. Bonding to tooth structure: a comparison of glass-ionomer and composite-resin systems. *J Esthet Dent.* 1994; 6: 227-44.
11. Exterkate RA, Damen JJ, Tem cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. *Caries Res.* 2005; 39: 509-13.
12. Felton DA, Cox CF, Odom M, Kanoy BE. Pulpal response to chemically cured an experimental light-cured glass ionomer cavity liners. *J Prosthet Dent.* 1991; 65: 704-12.
13. Forsten L. Fluoride release of glass ionomer. *J Esthet Dent.* 1994; 6: 216-22.
14. Gaintantzopoulou MD, Willis GP, Kafrawy AH. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. *Am J Dent.* 1994; 7: 39-42.

15. Gao W, Smales RJ. Fluoride release/uptake of conventional and resin-modified glass ionomers, and compomers. *J Dent.* 2001; 29:301-6.
16. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentin in vitro. *J Dent.* 1996; 24: 125-8.
17. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glassionomer cements. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 687-95.
18. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res.* 1998; 77: 2012-9.
19. Griffin SG, Hill RG. Influence of glass composition on the properties of glass polyalkenoate cements. Part IV. Influence of fluoride content. *Biomaterials.* 2000; 21: 693-8.
20. Gurgel-Filho ED, Feitosa JPA, Teixeira FB, Paula RCM, Silva JBA, Souza-Filho Jr FJ. Chemical and X-ray analysis of five brands of dental gutta-percha cone. *Int Endod J.* 2003; 36: 302-7.
21. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 361-5.
22. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation [Ref. 10993-6]. Geneva: ISO; 1994.
23. International Organization for Standardization. Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials [Ref. 7405]. Geneva: ISO; 1997.

24. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [Ref. 10993-5]. 2nd ed.. Geneva: ISO; 1999.
25. Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res.* 1995; 74:1162-7.
26. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2003; 28: 251-9.
27. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental difusión and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2008 NOV 12. doi: 10.1007/s10565-008-9110-x.
28. Lee RH, Efron DT, Tantry U, Stuelten C, Moldawer LL, Abouhamze A, et al. Inhibition of tumor necrosis factor- α attenuates wound breaking strength in rats. *Wound Rep Reg.* 2000; 8: 547-53.
29. 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.
30. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59: 34-9.
31. de Mendonça AA, Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: e102-8.

32. Mezadri TJ, Tomáz VA, Amaral VLL. Animais de laboratório – cuidados na iniciação experimental. Florianópolis: UFSC; 2004.
33. Mori GG, Moraes IG, Nunes DC, Castilho LR, Poi WR, Capaldi MLPM. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. Dent Traumatol. 2009; 25: 209-12.
34. Mount GJ. Clinical performance of glass-ionomers. Biomaterials. 1998; 19: 573-9.
35. Mount GJ. Glass-ionomer cements: past, present and future. Oper Dent. 1994; 19: 82-90.
36. Murray PE, Garcia-Godoy F. Comparison of the clinical and preclinical biocompatibility testing of dental materials: are the ISO usage tests meaningful? J Biomed Mater Res. 2007; 81A: 51-8.
37. Nascimento AB, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CAS. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. Am J Dent. 2000; 13: 28-34.
38. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. Dent Mater. 2008; 24: 1702-8.
39. Olson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. J Endod. 1981; 7: 355-68.
40. Pascon EA, Spangberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: gutta-percha. J Endod. 1990; 16: 429-33
41. Payne MS, Horbett TA. Complement activation by hydroxyethylmethacrylate - ethylmethacrylate copolymers. J Biomed Mater Res. 1987; 21: 843-59.

42. Peez R, Frank S. The physical-machanical performance of the new Ketac™ Molar Easymix compared to commercially available glass ionomer restoratives. *J Dent.* 2006; 34: 582-7.
43. Postlethwaite AE, Seyer JM. Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor factor α (TNF- α) and a synthetic TNF- α 31-68 peptide. *J Exp Med.* 1990; 172: 1749-56.
44. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophages mitochondrial activity. *J Endod.* 1998; 24: 528-31.
45. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod.* 1999; 25: 114-7.
46. Scotti R, Tiozzo R, Parisi C, Croce MA, Baldissara P. Biocompatibility of various root canal filling materials ex vivo. *Int Endod J.* 2008; 41: 651-7.
47. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive systems. *J Endod.* 2000; 26: 512-6.
48. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials.* 2003; 24: 3853-8.
49. de Souza Costa CA, Teixeira, HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 2007; 81B: 175-84.
50. de Souza Costa CA, Giro EMA, Nascimento ABL, 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 Mater.* 2003; 19: 739-46.

51. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling H, Giro, EMA, de Souza Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 838-44.
52. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements *J Biomed Mater Res.* 1999; 48: 277-88.
53. 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.
54. Wataha JC, Ratanasathien S, Hanks CT, Sun Z. In vitro IL-1beta and TNF-alfa release from THP-1 monocytes in response to metal ions. *Dent Mater.* 1996; 12: 322-7.
55. Williams JA, Billington RW, Pearson GJ. The glass ionomer cement: the sources of soluble fluoride. *Biomaterials.* 2002; 23: 2191-200.
56. Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements. *Int J Prosthodont.* 1990; 3: 215-9.
57. Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. *J Endod.* 1975; 1: 395-402.
58. Woolford MJ, Chadwick RG. Surface pH of resin-modified glass polyalkenoate (ionomer) cements. *J Dent.* 1992; 20: 359-64.
59. Xie D, Brantley BM, Culbertson G, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16: 129-38.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude, principalmente, da sua propriedade de liberação e recarregamento por íons flúor^{17,18,21,22}, que está diretamente relacionada com a remineralização e com a redução do risco de desenvolvimento de cárie secundária^{10,14,52,62}, os cimentos de ionômero de vidro têm sido amplamente utilizados em procedimentos preventivos e restauradores⁴⁶.

Apesar de os efeitos remineralizadores do flúor serem extensamente estudados^{10,14,52,62}, dados referentes à sensibilidade de células pulpares ao flúor nas concentrações liberadas pelos CIVs ainda são escassos. Segundo Chang, Chou⁶ (2001), o flúor tem a capacidade de inibir o crescimento e a proliferação celular, a atividade respiratória mitocondrial e a síntese de proteínas em células pulpares em cultura, de uma forma dose e tempo dependente. Como o reparo do tecido pulpar depende da capacidade das células adjacentes à área de injúria proliferarem, migrarem para a região e secretarem proteínas da matriz dentinária⁶⁹, quando o material inibe a proliferação ou a função celular, pode alterar a síntese, a deposição e até a mineralização da matriz dentinária⁵⁶.

Além do flúor, outros íons e/ou elementos inorgânicos, como cálcio, sódio, silício, alumínio, estrôncio e zinco, também são liberados pelos cimentos de ionômero de vidro^{11,16,28}. Apesar de Soheili Majd et al.⁵⁴ (2003) mostrarem que os íons flúor, alumínio e zinco têm a capacidade de provocar estresse oxidativo, levando à apoptose e morte celular, nos materiais estudados por Stanislawski et al.⁶¹ (1999), apenas o zinco foi liberado em concentrações suficientemente altas (acima de 0,1 mM) para induzir esses efeitos citotóxicos. Entretanto, Lönnroth, Dahl⁴² (2001), quando avaliaram extratos do Fuji II LC

recém-manipulado, detectaram a liberação de 2,5 mM de flúor/mL e 1,1 mM de alumínio/mL e relacionaram esses altos valores com os severos efeitos citotóxicos observados em fibroblastos.

Nos CIVs modificados por resina, as pesquisas mostram que, somada à liberação de íons, ocorre, também, a liberação de monômeros orgânicos residuais, principalmente o 2-hidroxietil metacrilato, bem como de produtos da decomposição dos fotoiniciadores presentes na sua formulação, os quais apresentam elevado efeito citotóxico^{8,24,48,61}.

Como o tipo e a concentração dos componentes liberados pelos materiais odontológicos parecem exercer papel fundamental no seu comportamento biológico^{2,24,61}, no estudo 1 deste trabalho, foi realizada a análise de íons e de componentes orgânicos liberados por diferentes CIVs convencionais e modificados por resina. O Vitrebond foi o único material que liberou íons flúor e zinco em concentrações suficientes para causar efeitos citotóxicos (2,91 mM/mL e 0,65 mM/mL, respectivamente) e alumínio em quantidades detectáveis (0,44 mM/mL), porém insuficientes para promover citotoxicidade^{42,61}. Essa análise mostrou, também, que todos os CIVs modificados por resina liberaram quantidades detectáveis de HEMA e que apenas no extrato do Vitrebond foi identificado o iodobenzeno, produto resultante da decomposição do fotoiniciador cloreto de difenil iodo²⁴. Portanto, esses dados sugerem, pelo tipo e pela quantidade de componentes liberados, que, entre os materiais avaliados neste estudo, o Vitrebond é o que apresenta o maior potencial citotóxico.

Considerando que os componentes liberados pelos CIVs têm capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários^{3,23,26,40} e potencial para causar alterações no tecido pulpar^{29,55}, testes de citotoxicidade em cultura de células

pulpaes, em especial de linhagem odontoblástica, são indicados para a avaliação inicial do potencial de agressão desses materiais⁴³. Assim, o segundo estudo avaliou o efeito citotóxico dos extratos obtidos de diferentes CIVs sobre células de linhagem odontoblástica – MDPC-23, utilizando a análise da atividade respiratória mitocondrial^{1,44,57,60}, bem como de outras funções das células, como a produção de proteínas⁸ e a atividade da fosfatase alcalina²⁵, as quais, quando alteradas de forma permanente, levam, com o tempo, a alterações na morfologia e à morte celular. O Vitrebond foi extremamente citotóxico, determinando uma redução superior a 89% em todas as atividades celulares avaliadas. Os demais CIVs não promoveram alterações significativas na atividade respiratória mitocondrial, mas reduziram a produção de proteína total em relação ao controle entre 18,9% e 44,1%. O Fuji Lining LC foi o único material que não determinou redução significativa nessa atividade celular. Quanto à atividade da fosfatase alcalina, além do Vitrebond, apenas o Ketac Molar Easymix promoveu uma redução de 32,9%, que foi significativa em relação ao controle. In vivo, a redução na produção de proteína total associada à diminuição na atividade da fosfatase alcalina pode comprometer a deposição de matriz dentinária, bem como a sua mineralização⁷.

Como a capacidade dos produtos liberados pelos materiais odontológicos de alterar a viabilidade e a função celular influencia diretamente a resposta dos tecidos vivos^{49,50}, realizou-se o terceiro estudo com o intuito de avaliar a capacidade de diferentes CIVs de induzir a expressão de genes que codificam para IL-1 β e TNF- α , bem como avaliar a resposta tecidual quando esses materiais são colocados em contato direto com o tecido conjuntivo. Todos os CIVs induziram a expressão de genes que codificam para as citocinas

inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), e, no período mais curto de análise, a reação inflamatória caracterizou-se como moderada, com presença de células mononucleadas e de vasos sanguíneos dilatados e congestionados, a qual pode ter sido parcialmente influenciada pelo trauma causado durante a implantação dos tubos contendo os materiais^{55,60}. Entretanto, aos 15 dias, inflamação discreta e formação de cápsula fibrosa relativamente delgada foram observadas em resposta à maioria dos CIVs, com exceção do Ketac Molar Easymix e do Vitrebond, para os quais houve persistência da reação inflamatória moderada em meio à cápsula reacional espessa. Esses resultados sugerem que, embora os materiais tenham apresentado uma ação tóxica imediata aos tecidos vivos, esta pode ter sido neutralizada pela ação do sistema linfático na eliminação do agente agressor, promovendo condições adequadas para o início do processo de reparo⁵⁵. Porém, quando o material apresenta um maior potencial de toxicidade ou quando ocorre uma maior solubilização deste em ambiente úmido, como no caso do Vitrebond e do Ketac Molar Easymix, os mecanismos de defesa do organismo não conseguem realizar, rapidamente, a neutralização dos componentes tóxicos. Isso faz com que a reação inflamatória crônica persista por um período mais prolongado, podendo interferir no processo de reparo⁵⁵. Embora este estudo tenha tido como objetivo mostrar a reação tecidual em curtos períodos pós-operatórios (7 e 15 dias), outro estudo realizado em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos mostrou que a reação inflamatória induzida pelo Vitrebond reduziu com o tempo e que, aos 90 dias, houve reparo completo⁶⁰.

Adicionalmente, é difícil determinar *in vivo* a concentração dos componentes liberados pelo material que conseguem atingir a polpa depois de se difundir através da dentina^{3,26}. Pesquisas pré-clínicas realizadas em dentes

de animais^{12,15,20,47,63} e de humanos^{47,58,59} têm mostrado resposta favorável do complexo dentino-pulpar quando os CIVs modificados por resina são aplicados sobre dentina. Para o Vitrebond foi demonstrado que o componente líquido reage quimicamente com a dentina e que o produto resultante dessa reação promove a obliteração parcial dos túbulos dentinários⁶⁴. Isso pode reduzir ou até impedir a difusão dos componentes do material em direção à cavidade pulpar e, conseqüentemente, contribuir para a sua adequada biocompatibilidade quando aplicado como forrador cavitário, mesmo em cavidades profundas (<500 µm de espessura do remanescente dentinário)^{12,59}.

Portanto, apesar de o Vitrebond ter mostrado uma maior liberação de íons e componentes orgânicos, ter apresentado severos efeitos citotóxicos sobre as células de linhagem odontoblástica, bem como ter provocado, quando em contato direto com o tecido conjuntivo, uma reação inflamatória de grau moderado que persistiu até o período de 15 dias de pós-operatório, esses resultados não podem ser diretamente extrapolados para situações clínicas.

Assim, as pesquisas in vitro e aquelas que avaliam a reação tecidual local utilizando implantes em subcutâneo de animais auxiliam na identificação e na compreensão de muitos mecanismos celulares e moleculares envolvidos com os efeitos causados pelos materiais odontológicos. Porém deve-se considerar que um material altamente citotóxico in vitro e que provoca inflamação quando colocado diretamente em contato com o tecido conjuntivo pode ser biologicamente compatível quando aplicado de acordo com as suas indicações de uso.

REFERÊNCIAS*

1. Aranha AMF, Giro EMA, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006; 22: 864-9.
2. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ, et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dent Mater.* 2006; 22: 630-40.
3. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. *J Endod.* 1996; 22: 244-8.
4. Bullard RH, Leinfelder KF, Russell CM. Effect of coefficient of thermal expansion on microleakage. *J Am Dent Assoc.* 1998; 116: 871-4.
5. Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials.* 2005; 26: 745-53.
6. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91: 230-4.
7. Chen CC, Chen RCS, Huang ST. Enzymatic responses of human deciduous pulpal fibroblasts to dental restorative materials. *J Biomed Mater Res.* 2002; 60: 452-7.

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

8. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello F, Formisano S, Palumbo G, et al. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. *Arch Oral Biol.* 1998; 43: 65-71.
9. Coury TL, Willer RD, Miranda FJ, Probst RT. Adhesiveness of glass-ionomer cement to enamel and dentin: a laboratory study. *Oper Dent.* 1982; 7: 2-6.
10. Creanor SL, Awawdeh LA, Saunders WP, Foye RH, Gilmour WH. The effect of a resin-modified glass ionomer restorative material on artificially demineralized dentine caries in vitro. *J Dent.* 1998; 26: 527-31.
11. Czarnecka B, Limanowska-Shaw H, Nicholson JW. Buffering and ion-release by glass-ionomer cement under near-neutral and acidic conditions. *Biomaterials.* 2002; 23: 2783-8.
12. Duque C, Hebling J, Smith AJ, Giro EMA, Oliveira MF, de Souza Costa CA. Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in non human primate teeth. *J Oral Rehabil.* 2006, 33: 452-61.
13. Erickson RL, Glasspoole EA. Bonding to tooth structure: a comparison of glass-ionomer and composite-resin systems *J Esthet Dent.* 1994; 6: 227-44.
14. Exterkate RA, Damen JJ, ten Cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. *Caries Res.* 2005; 39: 509-13.
15. Felton DA, Cox CF, Odom M, Kanoy BE. Pulpal response to chemically cured and experimental light-cured glass ionomer cavity liners. *J Prosth Dent.* 1991; 65: 704-12.
16. Forss H. Release of fluoride and other elements from resin-modified glass-ionomers in neutral and acidic conditions. *J Dent Res.* 1993; 72: 1257-62.

17. Forsten L. Fluoride release of glass ionomer. *J Esthet Dent.* 1994; 6:216-22.
18. Forsten L. Fluoride release and uptake by glass ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials.* 1998; 19: 503-8.
19. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipids liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988; 67: 1438-41.
20. Gaintantzopoulou MD, Willis GP, Kafrawy AH. Pulp reactions to light-cured glass ionomer cements. *Am J Dent.* 1994; 7: 39-42.
21. Gandolfi MG, Chersoni S, Acquaviva GL, Piana G, Prati C, Mongiorgi R. Fluoride release and absorption at different pH from glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 441-9.
22. Gao W, Smales RJ. Fluoride release/uptake of conventional and resin-modified glass ionomers, and compomers. *J Dent.* 2001; 29: 301-6.
23. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996; 24: 125-8.
24. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res.* 1998; 77: 2012-9.
25. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingival of rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res.* 1995; 74: 1374-81.
26. Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 20-5.

27. Hamid A, Okamoto A, Iwaku M, Hume WR. Component release from light-activated glass ionomer and compomer cements. *J. Oral Rehabil.* 1998; 25: 94-9.
28. Hayacibara MF, Ambrosano GMB, Cury JA. Simultaneous release of fluoride and aluminum from dental materials in various immersion media. *Oper Dent.* 2004; 29: 16-22.
29. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999; 27: 557-64.
30. Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 361-5.
31. Hume WR, Mount GJ. In vitro studies on the potential for pulpal cytotoxicity of glass-ionomer cements. *J Dent Res.* 1988; 67: 915-8.
32. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation [Ref. 10993-6]. Geneva: ISO; 1994.
33. International Organization for Standardization. Dentistry- Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials [Ref. 7405]. Geneva: ISO; 1997.
34. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [Ref. 10993-5]. 2nd ed. Geneva: ISO; 1999.
35. Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res.* 1995; 74:1162-7.

36. Kakaboura A, Elaides G, Palaghias G. An FTIR study on the setting mechanism of resin-modified glass ionomer restoratives. *Dent Mater.* 1996; 12: 173-8.
37. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res.* 1997; 76:1502-7.
38. Kawai K, Takaoka T. Fluoride, hydrogen ion and HEMA release from light-cured GIC restoratives. *Am J Dent.* 2002; 15: 149-52.
39. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2003; 28: 251-9.
40. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2008 NOV 12. doi: 10.1007/s10565-008-9110-x.
41. 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.
42. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59: 34-9.
43. MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Cames DL. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J Dent.* 1998; 11: S11-6.

44. de Mendonça AA, Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104: e102-8.
45. Mount GJ. Glass-ionomer cements: past, present and future. *Oper Dent.* 1994; 19:82-90.
46. Mount GJ. Clinical performance of glass-ionomers. *Biomaterials.* 1998; 19: 573-9.
47. Murray PE, Garcia-Godoy F. Comparison of the clinical and preclinical biocompatibility testing of dental materials: are the ISO usage tests meaningful? *J Biomed Mater Res.* 2007; 81A: 51-8.
48. Oliva A, Della Ragione F, Salerno A, Riccio V, Tartaro G, Cozzolino A, et al. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials.* 1996; 17: 1351-6.
49. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophages mitochondrial activity. *J Endod.* 1998; 24: 528-31.
50. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. *J Endod.* 1999; 25: 114-7.
51. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glassionomer cement. *J Dent.* 2000; 28: 413-22.
52. Smales RJ, Gao W. In vitro caries inhibition at the enamel margins of glass ionomer restoratives developed for the ART approach. *J Dent.* 2000; 28: 249-56.
53. Smith DC. Development of glass-ionomer cement systems. *Biomaterials.* 1998; 19: 467-78.

54. Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials*. 2003; 24: 3-9.
55. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive systems. *J Endod*. 2000; 26: 512-6.
56. de Souza Costa CA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater*. 2001; 17: 230-40.
57. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*. 2003; 24: 3853-8.
58. de Souza Costa CA, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res Part B: Biomater*. 2007; 81B: 175-84.
59. de Souza Costa CA, Giro EMA, Nascimento ABL, 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 Mater*. 2003; 19: 739-46.
60. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2006; 22: 838-44.
61. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res*. 1999; 49: 277-88.

62. Tam LE, GPL, Yim D. In vitro caries inhibition effects by conventional and resin-modified glass-ionomer. *Oper Dent.* 1997, 22: 4-14.
63. 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.
64. Titley KC, Smith DC, Chernecky R. SEM observations of the reactions of the components of a light-activated glass polyalkenoate (ionomer) cement on bovine dentine. *J Dent.* 1996; 24: 411-6.
65. Wan ACA, Yap, AUJ, Hastings GW. Acid-base complex reactions in resin-modified and conventional glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999; 48: 700-4.
66. Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements. *Int J Prosthodont.* 1990; 3: 215-9.
67. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry: the glass-ionomer cement. *Br Dent J.* 1972; 132:133-5.
68. Xie D, Brantley BM, Culbertson G, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16: 129-38
69. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res.* 1985; 64:530-40.

ANEXO

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEEA nº 25/2007

Araraquara, 18 de fevereiro de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 18/02/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Efeitos de cimentos de ionômero de vidro sobre a secreção de mediadores inflamatórios" (Proc. CEEA nº 25/2007) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL** em **MARÇO/2011**.

Atenciosamente.

Prof. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO

Vice-Coordenadora no exercício da Coordenadoria do CEEA

À
Profª Drª ELISA MARIA APARECIDA GIRO
DD Pesquisador Responsável
Nesta

