

EFEITOS CITOTÓXICOS E BIOCOMPATIBILIDADE DE UMA RESINA ADESIVA EMPREGANDO DUAS METODOLOGIAS DE PESQUISA

CYTOTOXIC EFFECTS AND BIOCOMPATIBILITY OF A BONDING AGENT EMPLOYING TWO RESEARCH PROTOCOLS

Dr. Carlos Alberto de Souza COSTA*
Dra. Josimeri HEBLING**
Dr. Carl Thomas HANKS***

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Materiais biocompatíveis devem ser recomendados para aplicação em cavidades profundas e polpas expostas. Assim, o notável efeito citotóxico de agentes adesivos e seus componentes, bem como sua ação irritante sobre tecido conjuntivo pode limitar a aplicação destes materiais para determinadas terapias.

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade e a biocompatibilidade de um adesivo dentinário contemporâneo. Para isto, um solução composta pela mistura de 5µl do adesivo dentinário Syntac Sprint (SS - Vivadent, Schaan, Liechtenstein) com 995µl de meio de cultura foi aplicada em contato com células de linhagem odontoblástica (MDPC-23). No grupo controle, tampão fosfato (PBS) foi misturado com o meio de cultura. Decorrido o período de incubação de 120 minutos, o metabolismo celular foi determinado pela técnica do "methyltetrazolium" (MTT assay). Na avaliação in vivo, tubos de polietileno preenchidos com SS (Grupo 1) ou com um cimento de hidróxido de cálcio (Grupo 2, controle - Dycal, Caulk/Dentsply, Milford, DE, USA) foram implantados no tecido conjuntivo subcutâneo de 15 ratos. Decorridos 7, 30 e 60 dias, biópsias foram realizadas, as quais foram processadas para avaliação histológica em microscopia de luz. Para as células cultivadas, o adesivo SS reduziu o metabolismo celular em 98,2% quando comparado com o grupo controle (PBS). Para a metodologia de implantação, foi observado aos 7 dias para o SS, notável reação inflamatória com moderada quantidade de macrófagos adjacente à abertura tubular, associado à for-

mação de amplo cone reacional (712µm). Para o Dycal, ocorreu reação inflamatória discreta associada a cápsula com espessura média de 341µm. Com o decorrer dos períodos, a reação inflamatória regrediu, sendo que havia reparo total para o Dycal no período de 30 dias. No período de 60 dias, poucos macrófagos e células gigantes foram vistos em contato com o SS associados a formação de espessa cápsula fibrosa. Concluiu-se que o SS é um material altamente citotóxico sobre cultura de odontoblastos. Porém, quando implantado em tecido conjuntivo de ratos, tanto SS quanto Dycal foram classificados como biocompatíveis, de acordo com as normas e recomendações da ANSI/ADA. Todavia, quando SS liberou partículas para o interior do tecido conjuntivo do animal, este material manteve seu efeito irritante, não sendo considerado como biocompatível.

PALAVRAS-CHAVE

Inflamação; cultura de células; adesivos dentinários.

INTRODUÇÃO

Os materiais dentários não são considerados substâncias inertes. Atualmente, sabe-se que estes materiais quando aplicados no corpo, não só promovem dano tecidual, como também podem causar resposta específica, local e/ou sistêmica. Assim, deve-se entender os mecanismos pelos quais os materiais interagem com o ambiente biológico onde são aplicados: das substâncias que eles liberam, as propriedades de sua superfície, além de outras características.

Desta maneira, para compreender as propriedades biológicas de determinados materiais, algumas Organizações, tais como a American Society for Testing and

* Prof. Dr. do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara / Unesp

** Prof. Dr. do Departamento de Clínica Infantil Faculdade de Odontologia de Araraquara / Unesp

*** Department of Oral Medicine, University of Michigan, School of Dentistry / UofM, Pathology and Oncology

Materials (ASTM), American National Standards Institute/American Dental Association (ANSI/ADA), International Standards Organization (ISO) e outras, têm procurado estabelecer critérios para a avaliação dos testes de biocompatibilidade^{1,2,13,14,21}. Cada critério apresenta diferentes tipos de avaliação, porém sempre com temas comuns. Dentro dos critérios propostos, uma sequência de testes foi determinada dividindo-os em níveis: teste "inicial", "secundário", e teste de "uso".

Como já relatado por Hanks et al.¹¹ (1996), a aplicação dos testes de citotoxicidade *in vitro* para o desenvolvimento de materiais odontológicos, além de ser uma técnica de custo relativamente baixo, também reduz a probabilidade de surpresas quanto de sua aplicação em dentes de animais ou humanos. Sem testes laboratoriais prévios, os testes posteriores de biocompatibilidade *in vivo* poderiam se tornar caros e consumir longo período de tempo.

Dentre as variadas metodologias indicadas pela ANSI/ADA com relação aos testes secundários para avaliação da biocompatibilidade dos materiais odontológicos, pode-se destacar o teste de "implantação". Este teste consiste em posicionar o material em contato com tecido semelhante àquele no qual ele será aplicado em procedimentos clínicos. Assim, os implantes são realizados em tecido conjuntivo subcutâneo, tecido muscular ou ósseo de animais.

Os sistemas adesivos contemporâneos foram desenvolvidos para aderir à esmalte, dentina, amálgama, metal e porcelana. Estas importantes propriedades adesivas fornecem aos cirurgiões dentistas a possibilidade de aplicar estes materiais odontológicos em diversos procedimentos clínicos²¹. Ainda, restaurações adesivas apresentam uma série de vantagens sobre as restaurações convencionais não adesivas, tais como redução na microinfiltração na interface dente restauração¹¹. A técnica adesiva fornece ainda a vantagem de minimizar a sensibilidade pós-operatória, reduzir a possibilidade de mancha da margem das restaurações e as próprias recidivas de cárie^{10,11}. A técnica adesiva ainda reduz o estresse funcional que frequentemente ocorre tanto no dente quan-

to no material restaurador, protegendo e fortalecendo a estrutura dentária²¹. Notável evolução na técnica de restaurações estéticas tem sido obtida com a utilização dos sistemas adesivos, sendo que restaurações deterioradas ou fraturadas podem ser reparadas com o mínimo de perda para o elemento dental.

Atualmente, a técnica de aplicação de sistemas adesivos no assoalho de cavidades profundas ou seu uso como agente capeador pulpar direto associados a condicionamento ácido total tem sido amplamente discutido e até recomendado por alguns profissionais. Todavia, para que um determinado material possa ser adequadamente recomendado para aplicação clínica, testes laboratoriais, bem como estudos em animais devem ser previamente realizados^{4,12,17,18,22}. Assim, o objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar, de maneira efetiva, a citotoxicidade e biocompatibilidade de uma resina adesiva aplicada em cultura de células odontoblastóides ou implantada no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

MATERIAL E MÉTODO 1

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico do sistema adesivo Sintac Sprint (SS, Vivadent, Schaan, Liechtenstein), 24 laminulas circulares de vidro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), com 12 mm de diâmetro foram posicionadas em um prato retangular de acrílico esterilizado (Costar, Cambridge, MA), o qual continha 24 compartimentos. As laminulas de vidro foram mantidas em álcool a 70% pelo período de 6 horas antes de serem usadas no presente trabalho, sendo posteriormente lavadas, sob agitação constante (por 15 minutos) com tampão fosfato (PBS).

Células de linhagem odontoblastica (MDPC-23) foram cultivadas em número de 30.000 células/cm² sobre as 24 laminulas de vidro posicionadas no fundo dos compartimentos. O meio de cultura utilizado nesta pesquisa foi o a-MEM com 10% de FBS, suplementado com penicilina, estreptomina e glutamina. O prato acrílico com as células cultivadas foram mantidos à 37°C em incubadora humidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar.

Setenta e duas horas após iniciar o cultivo celular, 995 µl de meio de cultura completo e 5 µl do SS (Grupo 1 - 12 espécimes) ou 5 µl de PBS (Grupo 2, controle - 12 espécimes) foram aplicados sobre as células cultivadas, onde permaneceram por 120 minutos. Então, o meio de cultura associado aos materiais experimentais e controles foi removido e substituído por novo meio de cultura completo, dentro do qual as células permaneceram por um tempo adicional de 4 horas. O metabolismo celular foi avaliado através da análise da atividade mitocondrial das células (MTT assay). Este método de avaliação da atividade metabólica celular foi realizado porque estudos prévios demonstraram que esta técnica é efetiva para estimar a citotoxicidade dos materiais empregados em odontologia²³. Detalhada metodologia de avaliação utilizando a técnica de MTT foi descrita por Wataha et al.²³ (1992). A morfologia das células MDPC-23 foi avaliada (2 espécimes representativos de cada grupo) através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após fixação dos espécimes por 24 horas em 2.5% de glutaraldeído em tampão de Sorensen, pós-fixação por 1 hora em tetróxido de ósmio e processamento para ponto crítico.

MATERIAL E MÉTODO 2

Foram utilizados 15 ratos (*Rattus Norvegicus*, Holtzman), machos, adultos, pesando em média 250 gramas, os quais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% por via intraperitoneal (0,4 ml de anestésico para cada 100 grs de peso do animal) e logo colocados em mesa operatória. Após tricotomia da região dorsal média, foi realizado a antisepsia do campo operatório com algodão estéril embebido em álcool iodado e álcool éter. Após incisão central, equidistante da inserção da cauda e cabeça, foi realizada a divulsão lateral com auxílio de uma tesoura de ponta romba, confeccionando assim duas lojas cirúrgicas, uma a cada lado da incisão, para a acomodação dos implantes. Tubos de polietileno medindo 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno, tiveram uma de suas extremidades fechadas à quente, sendo então mantidos em solução de formaldeído a 2% pelo período de 12

horas. Os tubos de polietileno foram preenchidos com a resina adesiva Syntac Sprint (SS, Grupo 1 - Vivadent, Schaan, Liechtenstein), a qual foi fotopolimerizada (Curing Light XL 1000, 3M Co., St. Paul, MN, USA) conforme especificação do fabricante e implantados na loja cirúrgica preparada no lado esquerdo do dorso dos animais. A fonte de luz foi checada imediatamente antes da preparação de cada espécime para posterior implante, através da utilização de um radiômetro (Demetron Research Corporation, Division of Kerr Corporation, Danbury, CT, USA). A intensidade de luz não era inferior a 400 mW/cm^2 . No grupo controle, os tubos foram preenchidos com o cimento de hidróxido de cálcio (Dycal, Grupo 2 - Caulk/Dentsply, Milford, DE, USA) manipulado de acordo com a recomendação do fabricante, sendo implantados nas lojas cirúrgicas preparadas no lado direito do dorso dos animais. As bordas das feridas foram aproximadas e suturadas com fio de seda montado no 4.0.

Após os períodos de 7, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados, e as biópsias cirurgicamente obtidas, as quais permaneceram em formalina tamponada a 10% por 72 horas, então processados e incluídas em parafina. Cortes semi-seriados com $6 \mu\text{m}$ de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina/eosina para análise histopatológica em microscopia de luz (Carl Zeiss 62774, Oberkachen, West Germany).

Os resultados foram descritos através de avaliação subjetiva cega. Os eventos histopatológicos avaliados foram: resposta inflamatória, espessura da cápsula fibrosa adjacente aos materiais implantados, e presença de macrófagos/células gigantes, tal como descrito por Costa et al.⁴ (1996). A resposta inflamatória foi classificada em (1) ausente, (2) discreta, (3) moderada, e (4) intensa, de acordo com o número de células inflamatórias próximas aos materiais experimentais e controle. Para isto, cinco áreas foram determinadas ao redor da abertura tubular, região principal de análise, e o número de células no local foi contado como descrito por Morse et al.¹³ (1981). A espessura da cápsula fibrosa foi medida para cada espécime, com o auxílio de um micros-

cópio de luz DIASTAR (Cambridge Instruments, Buffalo, NY, USA) com objetiva para aumento de 25/0.4, uma câmera de vídeo DXC - 107A/107AP (Sony Eletronics Ins., Japan) adaptada ao microscópio, um microcomputador 486 DX - 66 Mhz e um software analisador de imagens (Mocha Jandel Scientific, San Rafael, C.A., USA). Uma cápsula fibrosa com espessura inferior a $150 \mu\text{m}$ foi classificada como (1) delgada, enquanto uma cápsula com espessura superior a $150 \mu\text{m}$ foi classificada como (2) espessa. Presença de macrófagos/células gigantes foi relatada como (1) ausente, (2) discreta, e (3) moderada, de acordo com o número destas células presentes próximo aos materiais em teste. A avaliação do número celular foi realizada como descrito anteriormente para o evento resposta inflamatória.

Os materiais experimentais foram considerados biocompatíveis quando a intensidade da reação tecidual decresceu com o decorrer dos períodos. Assim, para ser considerado biocompatível, um determinado material em teste deveria permitir, aos 60 dias, formação de delgada cápsula fibrosa ao redor do tubo de polietileno, bem como haver ausência de reação inflamatória e/ou macrófagos/células gigantes. O material foi considerado não biocompatível quando uma persistente resposta inflamatória ocorreu, associada a não formação de cápsula fibrosa mesmo no período experimental mais longo (60 dias), caracterizando retardo ou mesmo ausência de reparação tecidual local.

RESULTADOS

Para a metodologia de cultura de células, a resina adesiva Syntac Sprint reduziu o metabolismo celular em 98,2% quando comparado com o grupo controle. No grupo experimental SS o número de células aderidas à lâmina de vidro foi significativamente reduzida. Estas células em contato com o material resinoso apresentavam ruptura da membrana citoplasmática, caracterizando células em processo de morte. Em algumas situações, estas células apresentavam longos processos citoplasmáticos, os quais pareciam manter estas células aderidas ao substrato de cultura (Figura 1). Para o

grupo controle (PBS) as células recobriam toda lâmina de vidro, sendo que o metabolismo celular era normal com as células apresentando organização em nódulos com finos processos citoplasmáticos aderindo-as ao substrato de cultura (Figura 2).

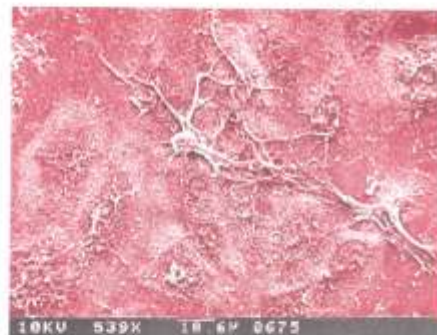


Figura 1 - Metodologia 1, Grupo 1. A solução composta por $5 \mu\text{l}$ de SS em $995 \mu\text{l}$ de meio de cultura foi colocada em cada recipiente, onde células odontoblastóides MDP-23 estavam cultivadas sobre lâminas redondas de vidro, posicionadas em seu assoalho. Note que somente duas células permaneceram aderidas ao vidro. Uma destas células perdeu completamente sua morfologia normal, enquanto a outra exibe forma arredondada com longos e finos prolongamentos citoplasmáticos. MEV, x 539.



Figura 2 - Metodologia 1, Grupo 2 - controle. Um grande número de células que receberam tratamento com a solução composta por $5 \mu\text{l}$ de PBS em $995 \mu\text{l}$ de meio de cultura permanecem aderidas à lâmina de vidro posicionada no assoalho do recipiente plástico. MEV, x 300.

Para a metodologia de implantação do material resinoso em tecido conjuntivo subcutâneo, foi possível observar aos 7 dias para o Grupo 1 (Syntac Sprint), reação inflamatória intensa com infiltrado inflamatório misto associado a intensa proliferação fibro-angioblástica. Consequentemente, a cápsula reacional apresentava-se espessa com intensa quantidade de macrófagos, sendo que sua espessura média era de $712 \mu\text{m}$ (Figura 3). Não foi observado presença de células gigantes. No período de 30 dias, foi possível observar que para três espécimes, a reação inflamatória moderada desencadeou formação de espessa cápsula

reacional, a qual era composta por infiltrado de células mononucleares, numerosos vasos sangüíneos congestionados e organização de fibras de colágeno e fibroblastos. Por outro lado, em dois espécimes houve regressão do quadro inflamatório, sendo que a cápsula fibrosa era delgada com poucas células e muitas fibras de colágeno e fibroblastos organizados. Moderada quantidade de macrófagos associado à poucas células gigantes multinucleadas foi observado adjacente ao material experimental. Nos dois espécimes onde havia presença de delgada cápsula fibrosa, apenas discreta quantidade de macrófagos foi observado (Figura 4). A espessura média das cápsulas foi de 311µm. No último período de avaliação (60 dias), foi possível determinar que, apesar da regressão da reação inflamatória tecidual, o adesivo dentinário Syntac Sprint ainda permaneceu como irritante ao tecido conjuntivo. Em dois espécimes a reação inflamatória se manteve moderada, sendo discreta nos outros três casos. Esta persistência do quadro inflamatório contribuiu definitivamente para a formação, em dois espécimes, de espessa cápsula reacional junto à abertura tubular. Nestes dois espécimes foi observado extravasamento de material resinoso para o interior do tecido conjuntivo do animal, o que resultou na presença de numerosas células gigantes multinucleadas (Figura 5). Nos demais espécimes, a delgada cápsula reacional exibia não significativa/discreta quantidade de macrófagos e presença de raras células gigantes. A espessura média das cápsulas formadas adjacente ao material resinoso foi de 199µm.

Para o Grupo 2 (controle, hidróxido de cálcio - Dycal) foi observado aos 7 dias, reação inflamatória moderada em quatro espécimes, sendo discreta em apenas um. Este quadro inflamatório, onde havia infiltrado inflamatório misto associado à proliferação fibro-angioblástica, edema e áreas de degradação de colágeno, foi responsável pela formação de espessa cápsula reacional junto a abertura tubular. A espessura média das cápsulas foi de 341µm. Porém, discreta quantidade de macrófagos estava presente na área reacional, sem que

células gigantes pudessem ser observadas (Figura 6). No período intermediário de avaliação (30 dias), os cortes histológicos revelaram ocorrência de notável regressão no quadro inflamatório. Enquanto em um espécime a reação inflamatória adjacente ao material era não significativa, em outros quatro casos foi observado discreta quantidade de células inflamatórias de predomínio mononuclear (Figura 7). Ainda, em quatro espécimes a cápsula reacional formada junto à abertura tubular era delgada, sendo determinada como espessa em apenas um caso (espessura da cápsula era 178µm). Apesar da ausência de células gigantes, discreta presença de macrófagos foi observada em dois espécimes. A espessura média das cápsulas foi de 129µm. Um evento histológico observado em dois dos cinco espécimes avaliados foi o discreto deslocamento de parte do mate-

rial implantado do interior do tubo para o tecido adjacente, permanecendo no interior da delgada cápsula fibrosa. No período de 60 dias foi observado formação de delgada cápsula fibrosa junto à abertura tubular, a qual apresentava-se composta apenas por densa deposição de fibras de colágeno com fibroblastos de permeio. A espessura média das cápsulas formadas junto à abertura tubular era de 54µm. Esta cápsula continua com aquela formada na superfície lateral do tubo, não exibiu material experimental no seu interior e nem presença de macrófagos ou células gigantes no local. Este quadro histológico foi comum para os cinco espécimes avaliados (Figura 8).

A descrição do resultado, determinado através da graduação dos eventos histológicos observados de acordo com sua intensidade está disposta na Tabela 1.

Tabela 1 - Escores da reação do tecido conjuntivo de acordo com o material experimental e controle, períodos experimentais e eventos histológicos avaliados.

Materiais	SS	Dycal	SS	Dycal	SS	Dycal
	7 dias	7 dias	30 dias	30 dias	60 dias	60 dias
Período	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Reação Inflamatória						
Não significativa	0	0	0	1	0	5
Discreta	0	1	2	4	3	0
Moderada	0	4	3	0	2	0
Intensa	5	0	0	0	0	0
Cápsula Fibrosa	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Delgada	0	0	2	4	3	5
Espessa	5	5	3	1	2	0
Macrófagos/células gigantes	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Não significativa	0	0	0	3	2	5
Discreta	0	5	2	2	3	0
Moderada	5	0	3	0	0	0

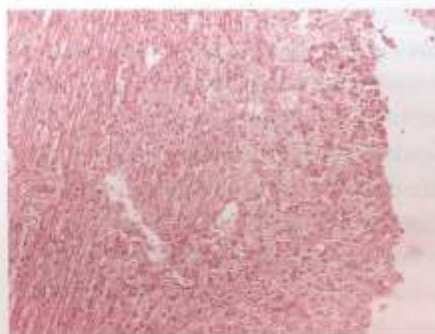


Figura 3 - Metodologia 2, Grupo 1 - 7 dias. Observe a ampla área de reação inflamatória adjacente à abertura tubular. Numerosos vasos sangüíneos congestionados em meio a células inflamatórias de padrão misto caracterizam a espessa cápsula reacional. H/E, 125x.

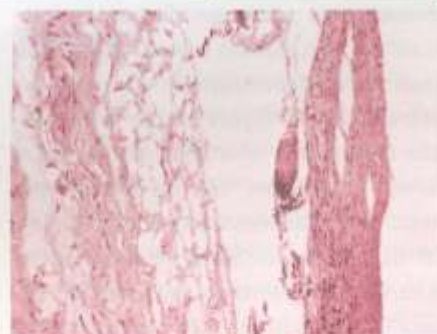


Figura 4 - Metodologia 2, Grupo 1 - 30 dias. Houve notável regressão na reação inflamatória adjacente ao material experimental. Note que a cápsula reacional é delgada e fibrosa. Todavia, macrófagos e um células gigantes ainda persistem no local. H/E, 125x.

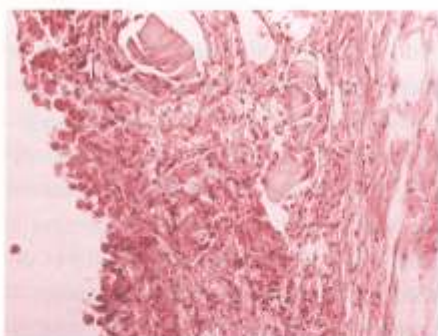


Figura 5 - Metodologia 2, Grupo 1 - 60 dias. Neste espécime, houve extravasamento do material adesivo para o interior do tecido conjuntivo. Observe que nesta condição, a cápsula reacional se manteve espessa com numerosos macrófagos e algumas células gigantes de peritubo. H/E, 125x.

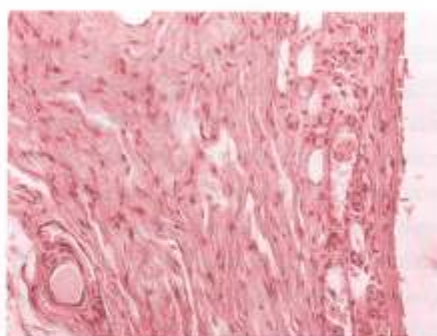


Figura 6 - Metodologia 2, Grupo 2 - 7 dias. Numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos associados a células inflamatórias, principalmente mononucleares, caracterizam a cápsula reacional formada junto à abertura tubular. H/E, 125x.

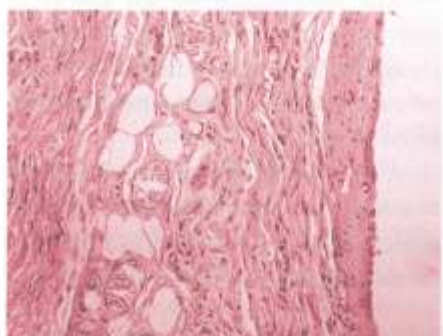


Figura 7 - Metodologia 2, Grupo 2 - 30 dias. Observe que delgada cápsula fibrosa densa com predomínio de fibroblastos e fibras de colágenas está presente junto à abertura tubular. O tecido conjuntivo subjacente exibe características histológicas de normalidade. H/E, 125x.

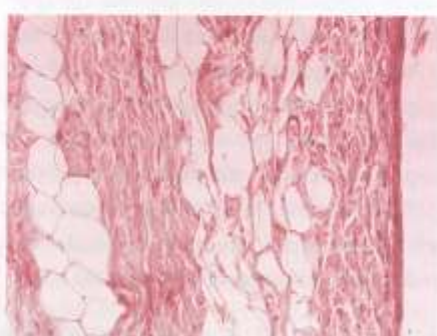


Figura 8 - Metodologia 2, Grupo 2, 60 dias. Note a delgada cápsula presente adjacente à área do tubo anteriormente preenchida com Dycal. Não há reação inflamatória no local. H/E, 125x.

DISCUSSÃO

Já está bem estabelecido que os testes de citotoxicidade e biocompatibilidade dos materiais dentários devem seguir protocolos de pesquisa previamente recomendados e descritos por diversas Organizações e Federações Internacionais. Dentro deste contexto, foi sugerido, através do Documento da ADA/ANSI¹ (1982), que nos testes "iniciais" estão incluídos os modelos para citotoxicidade *in vitro*, lise da membrana de células sanguíneas, mutagênese e carcinogênese a nível celular. Baseado nos resultados dos testes "iniciais", os materiais são submetidos a um ou mais testes "secundários" em pequenos animais (*in vivo*), para avaliar seu potencial inflamatório e/ou imunogênico. Estes testes "secundários" são: de irritação dérmica, implante subcutâneo ou ósseo, e testes de hipersensibilidade. Finalmente, os materiais que passaram pelos testes "iniciais" e "secundários", são submetidos aos testes de "uso" (*in vivo*), nos quais eles serão avaliados dentro de seu objetivo de aplicação clínica, primeiro em grandes ani-

mais (principalmente primatas) e posteriormente em humanos (após aprovação da Food and Drug Administration²). Esta sequência de testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos tem sido amplamente reconhecida pelos fabricantes e pesquisadores como importante na redução de tempo e custos para o desenvolvimento de um material no campo dos materiais dentários e em outras áreas da biotecnologia³.

Um dos principais testes iniciais (*in vitro*) são aqueles onde os materiais são aplicados em contato com células cultivadas em laboratório. Cada componente do material que se quer avaliar pode ou não ser isolado e aplicado sobre as células, sendo possível assim, determinar a citotoxicidade do material experimental ou demonstrar qual componente do material é o mais tóxico e qual concentração dele seria ou não agressiva às células. Nesta metodologia de pesquisa, pode-se avaliar a morfologia celular, alterações na síntese de proteínas, respiração mitocondrial (MTT assay), quantidade total de proteínas e

outras atividades metabólicas e/ou enzimáticas das células. Estes testes são relativamente baratos, rápidos e adequadamente padronizados^{4,26}. Na presente pesquisa, procurou-se seguir as recomendações de protocolos já descritos na literatura para determinar a citotoxicidade do agente adesivo Syntac Sprint. O material foi avaliado em sua composição natural, sem que seus componentes fossem isolados para estudo. O objetivo deste procedimento foi determinar a ação tóxica imediata do material aplicado diretamente sobre células, como pode ocorrer quando este material adesivo é utilizado como agente capeador. Dentro deste contexto, foi possível observar que o SS reduziu o metabolismo celular em 98,2% e causou dramática alteração morfológica nas células odontoblastóides ou mesmo sua morte. O efeito citotóxico de sistemas adesivos completos ou mesmo de seus componentes isolados foi descrito anteriormente em diversos trabalhos de pesquisa, onde se utilizou cultura de células^{5,12,17,18,22}. Costa et al.⁷ (1999) sugeriram que não somente os componentes resinosos destes materiais, mas também seu pH são fatores importantes que determinam a intensa citotoxicidade destes agentes adesivos. Na presente pesquisa, o pH do SS (0,22) pode ter sido um fator determinante no efeito citopático do material sobre as células odontoblastóides. Apesar de saber que resultados de pesquisas desenvolvidas *in vitro* ou mesmo em animais não devem ser de imediato extrapolados para situações clínicas, podemos especular que o SS aplicado em sua forma líquida (não polimerizada) sobre polpas expostas poderia resultar em sério dano imediato ao tecido pulpar, causando morte de muitas células no local. Talvez, com o passar do tempo este efeito tóxico possa ser compensado pela capacidade de reparação tecidual. Assim, com o objetivo de avaliar, de maneira preliminar, a capacidade de reparação de um tecido conjuntivo específico em contato com o SS, foi proposto neste mesmo trabalho de pesquisa, implantar este material resinoso no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos como uma metodologia complementar (teste secundário).

Dentre as variadas metodologias indicadas pela ANSI/ADA com relação aos testes secundários para avaliação da biocompatibilidade dos materiais odontológicos, pode-se destacar o teste de "implantação". Este teste consiste em posicionar o material em contato com tecido semelhante àquele no qual ele será aplicado em procedimentos clínicos. Assim, os implantes são realizados em tecido conjuntivo subcutâneo, tecido muscular ou osso de animais. Normalmente, os materiais avaliados nesta metodologia de pesquisa são aqueles que entrarão em contato com tecido pulpar, periapical, periodontal ou osso durante o tratamento odontológico. Após determinados períodos de tempo, biópsias são realizadas na área do implante, sendo que, após processamento laboratorial, os resultados são descritos por métodos histológicos comuns, histoquímicos, imunohistoquímicos ou por outras técnicas específicas. Nesta metodologia de pesquisa, é recomendada a utilização de grupos controle, sendo que quando os materiais em teste são de uso endodôntico ou estão indicados para entrar em contato com dentina e/ou polpa, eles podem ser implantados em tecido conjuntivo subcutâneo dos animais através do uso de tubos de polietileno ou de dentina. Pode-se também preparar corpos de prova do próprio material, padronizados quanto suas dimensões. Assim, os testes "secundários" são desenvolvidos com a finalidade de avaliar as possíveis reações inflamatória e/ou imune provocadas pelos materiais odontológicos e determinar a intensidade, período e extensão do quadro reacional. Neste nível de pesquisa, podem ser usados ratos, camundongos, hamsters ou coelhos⁵. Assim, baseado na recomendação deste teste secundário, a resina adesiva SS foi implantada em lojas cirúrgicas preparadas no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Como grupo controle, o cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) foi utilizado, como descrito em pesquisa anterior⁶. Os corte histológicos destes implantes revelaram que o SS desencadeou notável reação inflamatória inicial (7 dias) com presença de macrófagos, o que originou formação

de amplo cone reacional. Com o decorrer dos períodos, esta reação inflamatória regrediu. Porém, presença de macrófagos e também células gigantes foi observado no último período de avaliação (60 dias), o que foi responsável pela manutenção de cápsula reacional mais espessa do que aquela observada para o Dycal, o qual já havia permitido notável reparação tecidual no período intermediário de 30 dias. Em pesquisas recentes^{5,13} foi demonstrado que materiais resinosos implantados em tecido conjuntivo de ratos permanecem em contato com este tecido conjuntivo, sem que ocorra adequada fagocitose e digestão. Este fato foi caracterizado pela presença de persistente reação inflamatória mononuclear, a qual foi mediada por macrófagos e células gigantes. Estas células permaneciam em torno de glóbulos e resíduos de material resinoso disperso em meio ao tecido conjuntivo. Isto foi confirmado por outra pesquisa, onde "2-hydroxyethylmethacrylate" (HEMA) foi implantado, através da utilização de esponjas reabsorvíveis⁶. Num trabalho de pesquisa recente, foi sugerido que a manutenção de monômeros residuais inibidos pelo oxigênio presentes na superfície dos sistemas adesivos pode ser responsável pela reação inflamatória inicial, desde que estes monômeros na forma de ions hidroxila podem agir como radicais livres levando a danos à membrana das células ou mesmo causando sua morte⁵. Todavia, discreta, porém persistente reação inflamatória mediada por macrófagos e células gigantes pode ocorrer devido a continua liberação de componentes resinosos em meio ao tecido conjuntivo do animal¹⁴. Segundo Geurtsen¹⁷ (1998), há dois mecanismos pelos quais materiais polimerizados podem se solubilizar: 1) monômeros não convertidos e/ou aditivos do material são liberados por solventes; e 2) componentes solúveis são liberados por degradação ou erosão com o decorrer do tempo. Assim, podemos especular que materiais adesivos, tal como o SS podem permitir liberação de seus componentes, os quais interferem definitivamente com o mecanismo de reparação tecidual. Se semelhante processo reacional

persistente ocorrer no tecido pulpar capeado com sistemas adesivos, certamente os componentes resinosos dispersos poderão interferir negativamente na reparação pulpar e formação de ponte de dentina. Todavia, pesquisas in vivo com uso do SS como agente capeador de polpas (teste de aplicação clínica) devem ser realizados para comprovar estas especulações.

Baseado nos resultados observados na presente pesquisa, foi possível concluir que o agente adesivo Syntac Sprint foi altamente citotóxico para células imortalizadas de linhagem odontoblástica (MDPC-23), cultivada em laboratório. Ainda, este material resinoso polimerizado foi mais irritante para o tecido conjuntivo do que o cimento de hidróxido de cálcio (Dycal). Porém, de acordo com as propostas de classificação de biocompatibilidade de materiais dentários e de acordo com a metodologia aplicada e condições experimentais, o adesivo dentinário SS foi considerado um material biocompatível. Apenas nas situações onde componentes do SS se dispersaram para o interior do tecido conjuntivo desencadeando uma persistente reação inflamatória, este agente adesivo não foi considerado biocompatível.

AGRADECIMENTOS

A presente pesquisa foi parcialmente financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / FAPESP (processo # 00/7893-0), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo # 520027/2000-0) e NIDCR Research Grant # DE 09296 (USA).

ABSTRACT

The aim of this investigation was to evaluate the cytotoxic effects and biocompatibility of a current bonding agent using two different research protocols. In the in vitro study, the immortalized odontoblast cell line (MDPC-23) was plated (30.000cell/cm²) in 24 wells and allowed to grow for 72 hours at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air. In 12 wells, 995µl of fresh complete medium plus 5µl of the bonding agent Syntac Sprint

(Group 1 - SS, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) were applied on the culture cells for 120 min. In control group, 5µl of phosphate buffer (PBS) was added to the culture medium. This solution was applied in 12 wells with cultured cells in the bottom. Cell morphology was evaluated under SEM and the MTT assay was performed for mitochondrial respiration (cell metabolism). The bonding agent SS decreased the cell metabolism by 98.2%. The cells exhibited rounded shape or seemed to be in process of cell death, with disruption of the plasma membrane and persistent long cellular processes. In the *in vivo* study 30 polyethylene tubes were filled with the bonding agent SS (Group 1 - 20 tubes) or calcium hydroxide cement (Dycal, Group 2/control - Caulk/Dentsply, Mildford, DE, USA). The tubes were implanted into connective tissue of rats, which were killed after 7, 30, and 60 days. The implant sites were excised, immersed in 10% buffered formalin and processed using routine histological techniques. Sections of 6µm thickness were stained with H & E and assessed under light microscopy. At 7 days, SS triggered a remarkable inflammatory reaction with macrophages giving rise to a thick capsule formation at the tube opening. The connective reaction decreased with time. Connective healing occurred at 60 days in spite of the presence of macrophages and giant cells adjacent to the experimental material. Dycal allowed complete healing at 30 days with a thin fibrous capsule formation. Based upon the results observed in the present investigation it can be concluded that SS presents high cytotoxic effects on the MDPC-23 cells. According to the ANSI/ADA recommendation, SS and Dycal are both biocompatible with the connective tissue of rats. However, SS is not considered as a biocompatible material when it releases resin particulates into the connective tissue of rats. In this specific situation, SS is more irritant than Dycal.

KEYWORDS

Inflammation; cell culture; dentin bonding agents.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMERICAN DENTAL ASSOCIATION: addendum to American National Standards Document n 41 for recommended standard practices for biological evaluation for dental materials. Chicago, 1982.
- 2 - ASTM Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, v.13, n. 1, p. 262-279, 1983.
- 3 - COSTA C.A.S.; HEBLING, J.; HANKS C.T. Current status of pulp capping with adhesive systems: a review. *Dent. Mater.*, Copenhagen, v.16, n. 3, p. 188-197, May 2000.
- 4 - COSTA C.A.S.; HEBLING, J.; TEIXEIRA, M.F. Estudo preliminar da compatibilidade biológica dos adesivos dentários All Bond 2 e Scotchbond MP. Avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 11-18, Jan./Mar. 1996.
- 5 - COSTA, C.A.S. et al. Avaliação da biocompatibilidade do sistema adesivo Prime & Bond 2.0 e do cimento de hidróxido de cálcio - Dycal. Análise em microscopia de Luz. *Odontol. 2000 - Odontol. Sec. XXI*, Araraquara, v.1, n. 2, p. 8-12, Jul./Dec. 1997.
- 6 - COSTA, C.A.S. et al. Biocompatibility of an adhesive system and 2-hydroxyethyl methacrylate. *J. Dent. Child.*, Fulton, v.66, n. 5, p. 337-342, Sept./Oct. 1999.
- 7 - COSTA, C.A.S. et al. Cytotoxicity of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent. Mater.*, Copenhagen, v. 15, n. 12, p. 434-441, Oct. 1999.
- 8 - COSTA, C.A.S., et al. Biocompatibility of Two Current Adhesive Resins. *J. Endod.*, Baltimore, v. 26, n. 9, p. 512-516, Sept. 2000.
- 9 - CRAIG, R.G. Restorative dental materials. 10th ed. St. Louis: C V Mosby, 1997 p. 137-171.
- 10 - DUKE, E.S. Adhesion and its application with restorative materials. *Dent. Clin. North Am.*, Philadelphia, v. 37, n. 3, p. 329-340, July 1993.
- 11 - EICK, J.D. Quantitative analysis of the dentin adhesive interface by Auger spectroscopy. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 75, n. 4, p. 1027-1033, Apr. 1996.
- 12 - EICK, J.D. et al. Current concepts on adhesion to dentin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, Boca Raton, v. 8, n. 3, p. 306-335, 1997.
- 13 - GEURTSSEN, W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *Eur. J. Oral Sci.*, Cambridge, v. 106, n. 4, p. 687-695, 1998.
- 14 - HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. "In vitro" models of biocompatibility: a review. *Dent. Mater.*, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 186-193, Feb. 1996.
- 15 - INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. Biological evaluation of dental materials. Geneva: ISO, 1984. 54 p. (Technical Report 7403).
- 16 - INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva, 1993.
- 17 - JONTELL, M. et al. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 74, n. 5, p.1162-1167, May 1995.
- 18 - LUSTER, M.I. Immunotoxicology: review of current status. *Ann. Allergy*, v. 54, n. 5, p. 427-432, May 1989.
- 19 - MORSE, D.R. et al. A comparative tissue toxicity evaluation of the liquid components of gutta-percha root canal sealers. *J. Endod.*, Baltimore, v. 7, n. 12, p. 545-550, Dec. 1981.
- 20 - SCHMALZ, G. et al. A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J. Endod.*, Baltimore, v. 22, n. 5, p. 249-252, May 1996.
- 21 - SCHUSTER, G.S. et al. Biocompatibility of posterior restorative materials. *Calif. Dent. J.*, v. 24, n. 9, p.17-31, Sept. 1996.
- 22 - TYAS, M.J. A method for the *in vitro* toxicity testing of dental restorative materials. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 56, n. 10, p. 1285-1290, Oct. 1977.
- 23 - VAN MEURBEEK, B. et al. The clinical performance of adhesives. *J. Dent.*, Guildford, v. 20, n. 1, p. 1-20, Jan. 1998.
- 24 - WATAHA, J.C.; HANKS, C.T.; CRAIG, R.G. The *in vitro* effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v. 25, n. 9, p. 1133-1149, Sept. 1991.
- 25 - WATAHA, J.C.; HANKS, C.T.; CRAIG, R.G. *In vitro* synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v. 26, n. 10, p. 1297-1309, Oct. 1992.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa
Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp - Departamento de Fisiologia e Patologia - Laboratório de Patologia Experimental, sala 28 - Rua Humaitá, 1680 - CP: 331 - Centro, CEP: 14.801-903
Araraquara, São Paulo - Brasil