

EFEITO CITOTÓXICO DE UM NOVO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO POR RESINA APLICADO SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES.

CYTOTOXIC EFFECTS OF A CURRENT RESIN-MODIFIED GLASS-IONOMER CEMENT APPLIED ON ODONTOBLAST-LIKE CELLS.

Fernanda Campos Rosetti **LESSA**¹, Castelo Pedro Vemba **CIDADE**², Indri **NOGUEIRA**³, Josimeri **HEBLING**⁴, Carlos Alberto de **SOUZA COSTA**⁵

1- Aluna de doutorado do curso de pós-graduação em Ciências Odontológicas – área Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

2- Aluno de graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP e Estagiário do Departamento de Fisiologia e Patologia.

3- Aluna de mestrado do curso de pós-graduação em Ciências Odontológicas – área Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

4- Prof^ª. Livre-docente da disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

5- Prof. Livre-docente da disciplina de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Autor correspondente: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa - Departamento de Fisiologia e Patologia Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

R: Humaitá, 1680 – Centro. CEP: 14801-903, Araraquara - SP

Tel: + 55 (16) 3301 – 6477 / FAX: (16) 3301-6488 / E-mail: casouzac@foar.unesp.br

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Apesar da notável evolução da odontologia, alguns materiais dentários, tais como os agentes forradores de cavidades, continuam com as mesmas características desde há algumas décadas. Atualmente, um novo agente forrador foi desenvolvido, o qual foi acondicionado em clicker com os objetivos de prevenir possíveis erros de dosagem e facilitar a manipulação, reduzindo assim o tempo gasto nos procedimentos clínicos. Porém, para que um determinado material possa ser utilizado como forrador cavitário, este deve apresentar algumas propriedades específicas, entre elas um limitado efeito tóxico para as células pulpares.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos citotóxicos do cimento de ionômero de vidro modificado por resina VitrebondTM e da sua nova formulação VitrebondTM Plus quando aplicados em contato com células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Vinte e quatro corpos de prova padronizados foram confeccionados com cada um dos materiais experimentais, os quais foram imersos em meio de cultura α -MEM e incubados pelos períodos de 24 horas (Grupo 1 – VitrebondTM e Grupo 3 – VitrebondTM Plus) ou 7 dias (Grupo 2 - VitrebondTM e Grupo 4 – VitrebondTM Plus) para a obtenção dos respectivos extratos. Para os grupos controle 5 e 6, foi utilizado o meio de cultura α -MEM puro nos períodos de 24 horas ou 7 dias, respectivamente. Células MDPC-23 foram cultivadas (30.000 células/cm²) por 48 horas em placas de acrílico de 24 compartimentos, sendo que os extratos obtidos e a solução controle foram aplicados sobre elas por um período adicional de 24 horas. O metabolismo das células colocadas em contato com os extratos foi analisada através do teste de MTT, e a morfologia celular foi avaliada em MEV. Os dados numéricos obtidos pelo teste de MTT foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Para os Grupos 1, 2, 3, e 4, ocorreu redução percentual de 75,6%; 75%; 54,5%; e 73,6% no metabolismo celular, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2 ($p > 0,05$). O grupo 3 revelou ser estatisticamente menos citotóxico do que o grupo 4 ($p < 0,05$). Foi possível concluir que cimento VitrebondTM Plus apresentou reduzido efeito citotóxico inicial para as células em cultura quando comparado ao seu antecessor (VitrebondTM). Todavia, a dissolução tardia deste produto resultou em intenso efeito citopático para as células pulpares, tal como demonstrado para o VitrebondTM em ambos períodos de análise.

Palavras-chave: odontoblastos, citotoxicidade, cimentos de ionômero de vidro

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cytotoxic effects of the resin-modified glass-ionomer lining cement Vitrebond™ and its new formulation Vitrebond™ Plus when applied to an immortalized odontoblast-cell line MDPC-23. Twenty four standardized round-shaped samples were prepared with both dental materials. After light curing, the samples were immersed in culture medium (α -MEM) and incubated for 24 hours (Group 1: Vitrebond™ and Group 3: Vitrebond™ Plus) or 7 days (Group 2: Vitrebond™ and Group 4: Vitrebond™ Plus). Complete α -MEM was used as Control Groups 5 (24 hours) and 6 (7 days). The extracts obtained from both materials and the α -MEM were incubated for 24 hours in contact to the cultured MDPC-23 cells. The cell metabolic activity was evaluated by the MTT assay. Cell morphology was assessed by scanning electron microscopy (SEM). The data obtained from the MTT assay were submitted to the statistical analysis of Mann-Whitney. In Groups 1, 2, 3, and 4 the cell metabolism decreased by 75.6%, 75%, 54.5% and 73.6%, respectively. No statistical difference was observed between groups 1 and 2 ($p > 0,05$). Group 3 was statistically less cytotoxic than Group 4 ($p < 0,05$). It was concluded that Vitrebond™ Plus presents lower cytotoxic effects at short-time evaluation when compared to Vitrebond™. However, the degradation of Vitrebond™ Plus with time caused intense toxic effects to the cultured MDPC-23 cells as observed for Vitrebond™ in both periods of assessment.

Keywords: odontoblasts, cytotoxicity, glass ionomer cements

INTRODUÇÃO

Os testes de biocompatibilidade, efeitos carcinogênicos e mutagênicos de materiais odontológicos são de extrema importância, uma vez que na odontologia diferentes tipos de materiais utilizados para variados procedimentos operatórios podem entrar em contato com células da mucosa oral, gengiva marginal e/ou do complexo dentinopulpar. Diversos estudos também têm chamado a atenção para a relevância de se verificar o grau de citotoxicidade dos materiais odontológicos, considerando este um passo importante antes de sua aplicação clínica na cavidade bucal.¹⁻³

A American Dental Association (ADA) e American National Standards Institute (ANSI), em acordo com a ISO-10993, têm recomendado uma série de testes, os quais compreendem desde ensaios de citotoxicidade desenvolvidos em cultura de células, passando por testes em animais laboratoriais, até àqueles testes que são realizados em seres humanos.⁴

Dentre os variados materiais odontológicos utilizados atualmente, os cimentos de ionômero de vidro têm despertado um grande interesse por parte de muitos pesquisadores.⁵⁻⁷ Este material, introduzido por Wilson e Kent⁸ no ano de 1971, é basicamente composto por uma combinação de vidro fluoralumino silicato, polímero acídico e água ou solução de ácido tartárico.⁹ As propriedades associadas a esta classe de biomateriais incluem a adesão à estrutura dental, biocompatibilidade e uma mínima liberação de calor durante a sua manipulação.¹⁰

Esta primeira categoria de cimentos de ionômero de vidro introduzidos na odontologia recebeu o nome de cimentos ionoméricos convencionais (CIVs). Todavia, os CIVs têm passado algumas alterações na sua composição o que, de fato, acarretou em melhoria de algumas de suas propriedades físicas e mecânicas. A inclusão de monômeros hidrófilos e iniciadores de polimerização criaram os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMRs).¹¹ Esta nova geração de cimentos ionoméricos permite com que o material tenha seu tempo de trabalho aumentado, além de uma melhor resistência à perda ou ao ganho de água em sua estrutura.^{7,12} Além disso, este novo tipo de material associou a adesão aos tecidos duros e liberação de flúor dos cimentos oriundos de uma reação ácido/base com boas propriedades mecânicas das resinas compostas modernas.

Um dos objetivos principais quando do desenvolvimento de novos materiais dentários é o de facilitar o procedimento clínico para o profissional da área, bem como melhorar as propriedades destes novos materiais a serem empregados em procedimentos clínicos específicos. Dessa forma, está sendo colocado no mercado odontológico um novo CIVMR denominado de Vitrebond™ Plus (3M/ESPE, Sta Paul, MN, USA). De acordo com o fabricante, este material, além de apresentar maior facilidade de manipulação quando comparado ao Vitrebond™ comum, o qual está presente no

mercado odontológico há quase duas décadas, também apresenta propriedades mecânicas e biológicas superiores. Realmente, o acondicionamento do novo material na forma de pastas em uma seringa do tipo clicker, permite que quantidades iguais das pastas sejam manipuladas, evitando possíveis erros de proporção pó-/líquido, como ocorria para o Vitrebond™.

Desta maneira, pode-se sugerir que menores chances de erro na manipulação do Vitrebond™ Plus poderia resultar num cimento de melhor qualidade. Porém, não se sabe, até o momento, se este novo CIVMR apresenta menor efeito tóxico para células pulpares quando comparado ao Vitrebond comum. Assim, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi avaliar a potencial citotóxica de um novo cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrebond™ Plus) comparando os resultados com o seu antecessor (Vitrebond™).

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo das células MDPC-23

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura α -MEM (Minimum essen-

tial medium eagle alpha modification, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100 IU/mL e 100 μ g/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo CO₂ a 5% e na temperatura de 37°C. Estas células foram subcultivadas a cada três dias na concentração de 30.000 células/cm², até se obter o número de células suficiente para a execução do experimento.

Confeção dos corpos-de-prova

Para o preparo dos corpos de prova, foram utilizadas matrizes esterilizadas, as quais permitiam obter espécimes na forma de disco com dimensões padronizadas (4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura). Vinte e quatro corpos de prova foram confeccionados para cada material, os quais foram divididos de acordo com o tempo em que os espécimes foram mantidos em contato com o meio de cultura. Os materiais experimentais foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante. A composição de cada um dos materiais experimentais, bem como seu fabricante, proporções (em peso), e tempo de foto-ativação empregado, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Apresentação dos materiais experimentais demonstrando seus fabricantes, composição, proporção pó/líquido e tempo de polimerização.

Nome Comercial (Fabricante)	Composição	Preparação dos Materiais	Tempo de Fotoativação
Vitrebond™ (3M/ESPE)	Pó: >95% cristais de fluoralumino silicato (pó de vidro) e <2% cloreto de difenil iodônio Líquido: 35-45% ácido polialquenoico modificado, 20-30% 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) e 30-40% água.	Pó/líquido: 1,4 / 1,0 em peso	30 segundos
Vitrebond™ Plus (3M/ESPE)	Pasta: HEMA, Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato (Bis-GMA), água, iniciadores, cristais de fluoraluminossilicato radiopacos Líquido: ácido polialquenoico modificado; HEMA, água, iniciadores (canforoquinona)	Proporções iguais das pastas	20 segundos

Após preenchimento da matriz com o material experimental, colocou-se sobre ele uma tira de poliéster, sendo que sobre esta foi posicionada uma lâmina de vidro previamente esterilizada com 1mm de espessura. Este procedimento foi realizado para evitar a formação e permanência de bolhas no corpo de prova. Imediatamente sobre esta lâmina de vidro foi posicionada a ponta ativa do aparelho de fotopolimerização (Curing Light 3000 XL, 3M ESPE, St Paul, MN, USA), procedendo-se assim a fotoativação dos materiais pelo período de 30 segundos para o Vitrebond™ e de 20 segundos para o Vitrebond™ Plus. A intensidade de luz emitida pelo aparelho fotoativador ($450\text{mW}/\text{cm}^2$) foi

monitorada durante todo o experimento através de um radiômetro (Optiluz 500, Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA).

Os corpos de prova foram colocados em placas de 24 compartimentos (Costar, Cambridge, MA, USA) previamente preenchidos com 1,1 mL de meio de cultura α -MEM puro. Em seguida, as placas foram novamente colocadas em incubadora à 37°C , com 5% de CO_2 , 95% de ar pelos períodos pré-determinados de 24 horas ou 7 dias. Desta maneira, os extratos dos materiais em avaliação foram obtidos. A relação entre os grupos experimentais e controle de acordo com períodos de avaliação e número de espécimes estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação entre grupos experimentais e controle de acordo com os períodos de avaliação e o número de espécimes.

Grupos	Material	Tempo de extração	Número de amostras
G1	Vitrebond™	24 horas	12
G2	Vitrebond™	7 dias	12
G3	Vitrebond™ Plus	24 horas	12
G4	Vitrebond™ Plus	7 dias	12
G5	α -MEM	24 horas	12
G6	α -MEM	7 dias	12

CULTIVO DAS CÉLULAS E AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR

Um total de 30.000 células/ cm^2 foram semeadas em compartimentos de três placas de acrílico de 24 compartimentos esterilizadas e mantidas na incubadora à 37°C , com 5% de CO_2 , 95% de ar, durante 48 horas. Decorrido esse período de incubação, o meio de cultura de cada compartimento foi substituído pelos extratos obtidos e as placas foram mantidas por um período adicional de 24 horas na incubadora. O meio de cultura α -MEM puro foi utilizado como controle negativo. Os extratos obtidos de 10 corpos de prova para cada grupo experimental foram utilizados para avaliar a atividade metabólica das células, sendo que outras 2 amostras

foram processadas para análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para a determinação dos efeitos citotóxicos dos materiais, a análise colorimétrica do metiltetrazolium (teste do MTT) foi empregada.¹³ Para a realização deste teste, os extratos que permaneceram em contato com as células foram aspirados e substituídos por 900 μL de meio de cultura α -MEM, ao qual foi adicionado 100 μL de solução de MTT numa concentração de 5mg/mL de PBS. Após 4 horas de incubação das células em contato com a solução de MTT, esta foi aspirada, sendo então, aplicada uma solução de 600 μL de isopropanol acidificado em ácido clorídrico (HCl) a 0,04N. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional

à absorvância determinada a 570nm em leitor de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader-BIOTEK Instruments, ICC, USA). Para isto, três alíquotas de 100µL de cada compartimento foram removidas e colocadas em nova placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Com o objetivo de padronizar a leitura, os dois compartimentos iniciais dos recipientes foram preenchidos com 100µL da solução de isopropanol acidificado, para se determinar o valor correspondente à passagem total da luz, ou seja, ao valor máximo para a redução do metabolismo celular. Os resultados foram determinados através da média dos valores numéricos obtidos das três alíquotas selecionadas. Os valores finais obtidos para cada grupo experimental e controle foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

Análise da morfologia celular

Dois espécimes representativos de cada grupo foram submetidos à análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isto, antes de cultivar as células MDPC-23 nos compartimentos de acrílico (30.000células/cm²), lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro esterilizadas (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) foram posicionadas na base destes compartimentos. Assim, após os diferentes períodos de contato das células com os extratos e a solução controle, estas

foram aspiradas, sendo que as células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro foram imersas por 120 minutos em 1mL de glutaraldeído tamponado a 2,5%. Posteriormente, estas células foram submetidas a lavagem por três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 60 minutos, sendo então processadas para avaliação em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, USA).

RESULTADOS

Metabolismo celular (MTT)

Os resultados para o metabolismo celular estão demonstrados na Tabela 3 e Figura 1. A análise estatística demonstrou não existir diferença entre os grupos 1 e 2, onde observou-se uma redução do metabolismo celular em 75,6% e 75%, respectivamente ($p>0,05$). O grupo 3 revelou ser estatisticamente menos citotóxico do que o grupo 4 ($p<0,05$), com redução do metabolismo celular de 54,5% e 73,6%, respectivamente. Em relação ao período de extração, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 24h, sendo o grupo 1 o mais citotóxico, seguido do grupo 3. No período de extração de 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2 e 4, porém houve diferença entre estes grupos e o controle ($p<0,05$).

Tabela 3. Dados descritivos para a produção da enzima desidrogenase succínica (SDH), detectada pelo teste de MTT, segundo os grupos e períodos de avaliação.

Grupo	Período			
	24 horas		7 dias	
Vitrebond	0,134 (0,078-0,176)*	a, A**	0,109 (0,086-0,129)	a, A
Vitrebond Plus	0,230 (0,182-0,251)	a, B	0,115 (0,101-0,142)	b, A
Controle	0,505 (0,490-0,562)	a, C	0,435 (0,382-0,508)	b, B

* valores são mediana (mínimo-máximo)

** valores seguidos de letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$)

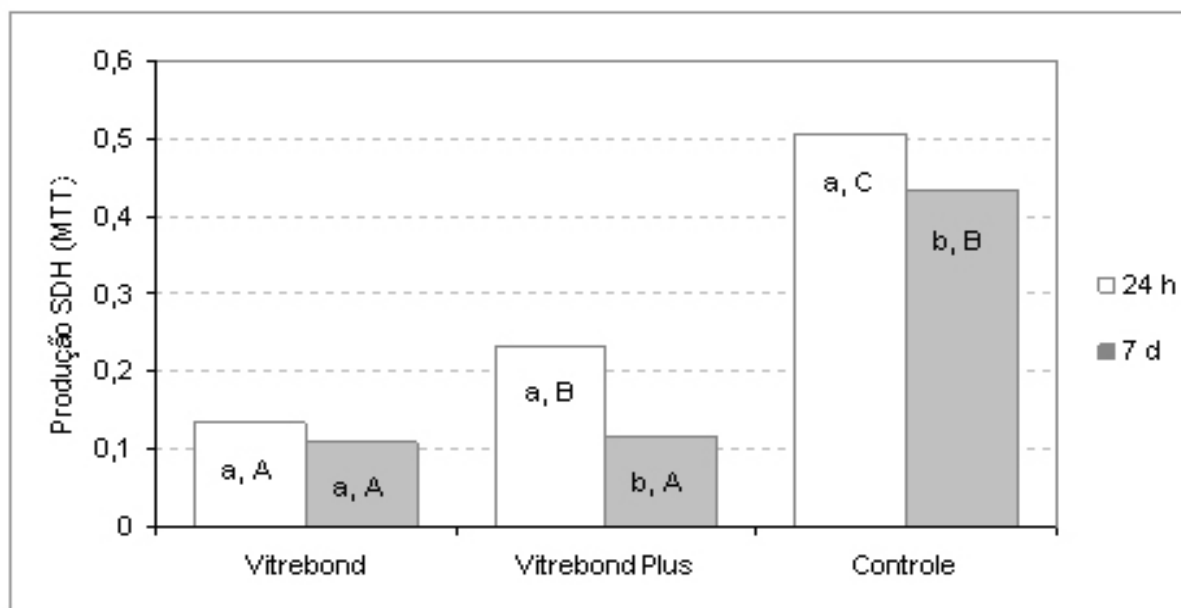


Figura 1. Produção da enzima desidrogenase succínica (SDH), detectada pelo teste de MTT, segundo os grupos e períodos de avaliação. Barras representam medianas, sendo que as indicadas por letras minúsculas iguais dentro de cada material e letras maiúsculas iguais dentro de cada período, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$)

Morfologia celular (MEV)

Foi possível demonstrar que nos grupos controle 5 e 6, as células MDPC-23 apresentavam-se organizadas em nódulos epitelióides, os quais estavam próximos da confluência (Figura 2a). Estas células, de maneira individual, exibiam forma alongada com finos e longos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Estes prolongamentos citoplasmáticos pareciam aderir às células MDPC-23

ao substrato de vidro (Figura 2b).

Nos grupos Vitrebond™, em ambos os períodos experimentais (24 horas e 7 dias), um número reduzido de células MDPC-23 permaneceu aderido ao substrato de vidro, exibindo forma arredondada com perda total ou manutenção de poucos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana (Figura 3a/b).

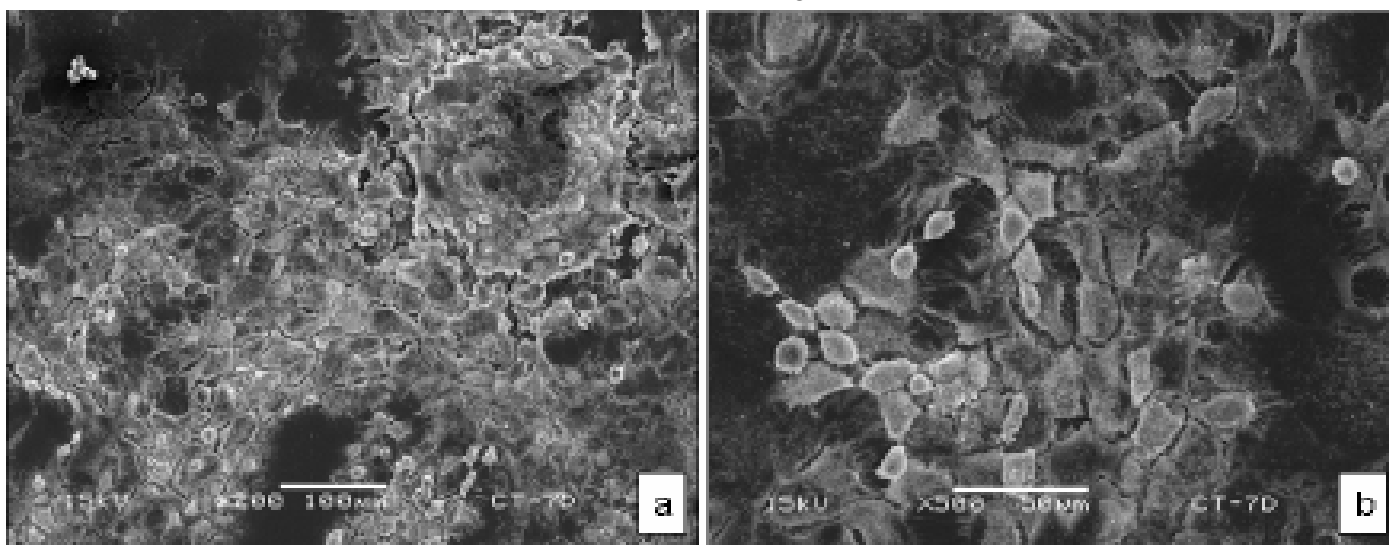


Figura 2a. Grupo 6 (controle): Células MDPC-23 aderidas ao substrato, as quais estão próximas da confluência, com formação de nódulos epitelióides. MEV, x200. **2b.** Grupo 6 (controle): Células exibiam forma alongada com finos e longos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Estes prolongamentos citoplasmáticos pareciam aderir às células MDPC-23 ao substrato de vidro. MEV, x500.

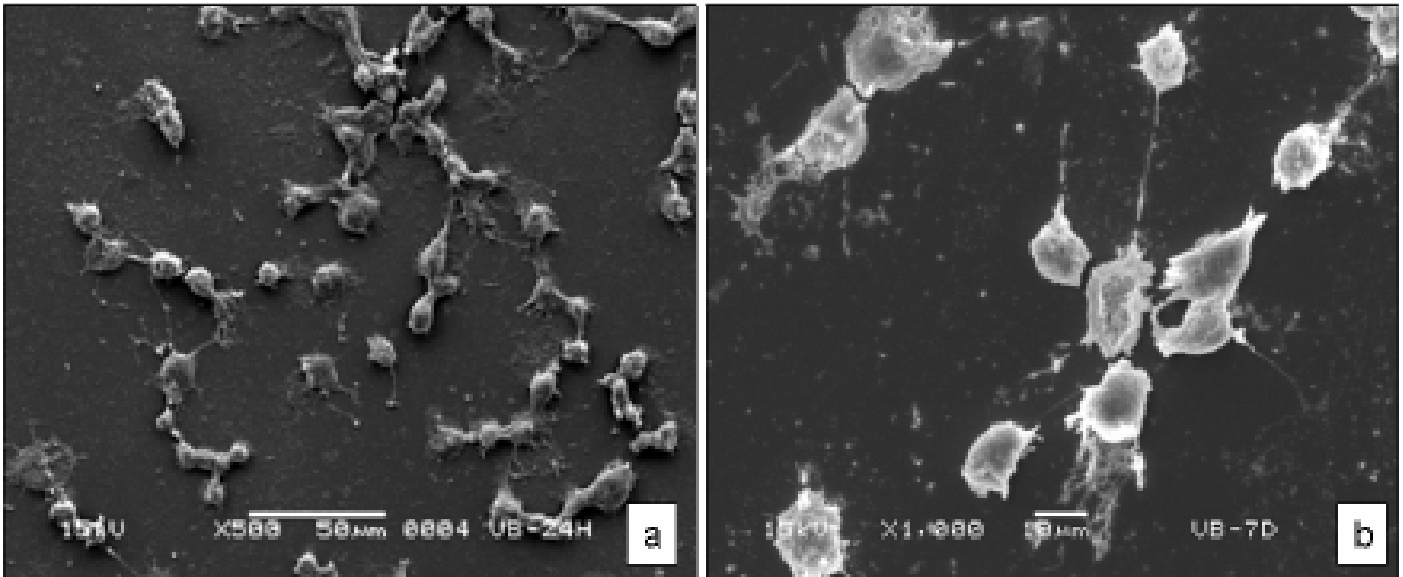


Figura 3a. Grupo 1: Observe um número reduzido de células MDPC-23 que permaneceu aderido ao substrato de vidro. MEV, x500. 3b. Grupo 2: Pode ser observado células exibindo forma arredondada com perda total ou manutenção de poucos prolongamentos citoplasmáticos. MEV, x1000.

Para o Vitrebond™ Plus no período de 24h (grupo 3), apesar do reduzido número de células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro quando comparado ao grupo controle, estas células apresentavam discretas alterações morfológicas (Figura 4a). O número de células observado para este grupo 3 foi sempre superior aos demais grupos experimentais tanto no período de 24 ho-

ras quanto de 7 dias. Este fato demonstrou que o Vitrebond™ Plus apresentou limitada citotoxicidade inicial. Todavia, para o grupo 4, onde os corpos de prova do Vitrebond™ Plus permaneceram em contato com o meio de cultura por 7 dias, extensas áreas com ausência de células e debris celulares aderidos ao substrato de vidro foram observados (Figura 4b).

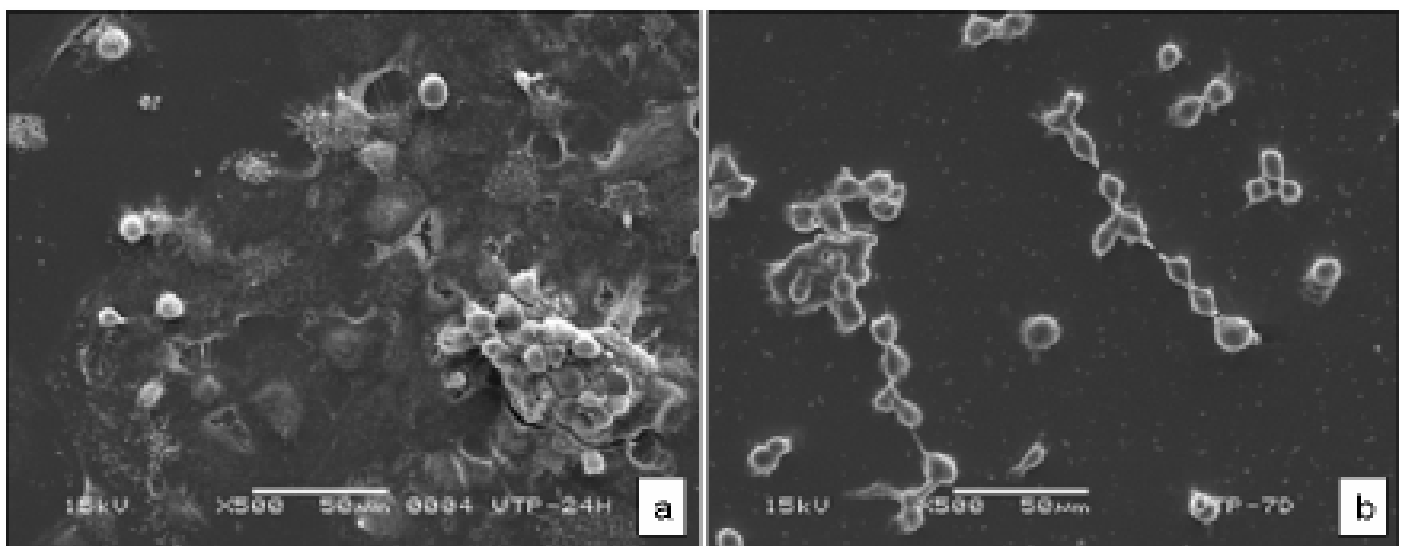


Figura 4a. Grupo 3: Note um menor número de células comparado ao grupo controle. Algumas células apresentavam características semelhantes ao grupo controle enquanto outras apresentavam tamanho reduzido e morfologia arredondada. MEV, x500. Figura 4b. Grupo 4: Extensas áreas com ausência de células e restos celulares pode ser observado. As células que permaneceram aderidas a lamínula de vidro apresentavam morfologia arredondada. MEV, x500.

DISCUSSÃO

No presente estudo, os efeitos citotóxicos dos cimentos ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR) Vitrebond™ e sua nova formulação Vitrebond™ Plus foram avaliados sobre as células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 por meio do teste colorimétrico do metiltetrazolium (teste do MTT) e análise complementar da morfologia celular em MEV. O teste de MTT representa a taxa de respiração mitocondrial das células em contato com extratos obtidos dos materiais experimentais através da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH). Metodologias semelhantes também têm sido utilizadas para avaliar os efeitos citotóxicos gerados por diferentes CIVMRs.^{12,14-16} Estes estudos revelaram que os componentes liberados por estes materiais iônicos são os principais responsáveis pelos efeitos tóxicos encontrados nas células.

Tem sido demonstrado que os CIVMRs são mais citotóxicos do que os cimentos convencionais (CIVs) por apresentarem o monômero HEMA

incorporado na sua composição.¹² Devido ao baixo peso molecular do HEMA e sua característica hidrófila, tem sido descrito que uma quantidade residual deste monômero pode facilmente difundir através dos túbulos dentinários e alcançar as células pulpares.¹⁷ Estes resíduos de monômeros de metacrilato podem ser incorporados na bicamada lipídica da membrana celular, levando a solubilização desta estrutura e conseqüente lesão celular irreversível.¹⁸ Além disso, outros componentes dos CIVMRs, como o fotoiniciador cloreto de difenil iodônio, pode aumentar os efeitos tóxicos do material pela liberação de seus produtos de decomposição, tais como cloreto de benzeno, brometo de benzeno e iodeto de benzeno.⁶

Na presente pesquisa, foi demonstrado que o Vitrebond™, em ambos os períodos de avaliação (grupos 1 e 2), reduziu o metabolismo celular em cerca de 75%. Para este material, não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de Ductod senequam. Icultuus, quo Cat. Um nonente inenihi lictem, cupervivem nempere fina, de extração, caracterizando uma rápida liberação dos seus componentes no meio de cultura imediatamente após sua imersão no meio líquido. Esses achados corroboram com os estudos de Costa et al.¹² (2003), Aranha et al.¹⁵ (2006) e Mendonça et al.¹⁶ (2007), uma vez que esses autores relataram que o cimento Vitrebond™ possui intenso potencial tóxico quando aplicado diretamente em contato

com células pulpares, causando uma redução do metabolismo celular em torno de 80%.

O líquido do Vitrebond™ Plus consiste basicamente dos mesmos componentes do Vitrebond™ comum. Entretanto, a pasta do Vitrebond™ Plus, apresenta maior quantidade de HEMA e Bis-GMA na sua composição, o que poderia indicar que este novo material pudesse ser mais tóxico do que seu antecessor. Isto porque o Bis-GMA além de causar depleção da glutathione intracelular, também interfere na expressão de algumas proteínas, tais como sialoproteína da dentina e colágeno tipo I, as quais são fundamentais no processo de reparação pulpar.¹⁹ Todavia, os resultados da presente pesquisa demonstraram que o extrato de 24 horas do Vitrebond™ Plus foi menos citotóxico do que o extrato de 7 dias. Desde que o Bis-GMA é uma molécula rígida, de alto peso molecular e baixa solubilidade em água, pode-se especular que sua maior concentração na pasta do Vitrebond™ Plus tenha reduzido a solubilidade deste cimento quando imerso em meio líquido. Assim, a reduzida liberação de Bis-GMA, pelo menos no período de 24 horas após imersão em meio de cultura, tenha determinado a menor citotoxicidade inicial do produto. Porém, neste período curto de avaliação, o produto reduziu em cerca de 50% o metabolismo celular, o qual ocorreu provavelmente devido à liberação de outros componentes do produto. Alguns pesquisadores determinaram que alguns íons, tais como Al^{3+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} e F^{-} são liberados pelos cimentos iônicos, sendo que elevada quantidade de Zn^{2+} pode causar intensos efeitos tóxicos.²⁰ Foi demonstrado ainda que a elevada concentração de íons F^{-} também pode ser encontrada em meio líquido, como resultado da dissolução de corpos de prova preparados com materiais iônicos. Estes íons F^{-} alteram o metabolismo celular e interferem na síntese de DNA das células.²¹ Porém, pesquisas recentes têm demonstrado que mais importante do que a liberação de íons, como acontece particularmente para os cimentos de ionômero de vidro convencionais, os monômeros residuais hidrófilos, tal como HEMA presentes nos CIVMRs atuais, exercem importante efeito tóxico.²²⁻²⁴ Além dos possíveis efeitos sobre os fosfolípidios da membrana citoplasmática das células, como anteriormente descrito, têm sido demonstrado também que o HEMA pode causar efeitos citotóxicos e genotóxicos por gerar estresse oxidativo nas células.²⁵ Desta maneira, pode-se sugerir que a presença de HEMA nos extratos obtidos para ambos materiais avaliados comparativamente e nos dois períodos de incubação, agiu de maneira decisiva no elevado percentual de inibição

do metabolismo celular. Assim, provavelmente a dissolução do Bis-GMA tenha participado mais efetivamente da elevação dos efeitos citotóxicos do Vitrebond™ Plus no período de 7 dias.

Os efeitos adversos causados pelos CIVMRs testados na presente pesquisa foram caracterizados também pela análise da morfologia e número das células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Para os dois materiais ionoméricos avaliados, houve notável diminuição no número de células, especialmente para os grupos 1, 2 e 4, o que caracterizou que a redução do metabolismo celular ocorreu, pelo menos em parte, pela morte direta das células MDPC-23 em cultura. Estes achados histológicos observados em MEV também foram anteriormente descritos para o Vitrebond™.^{12,15} Nestes estudos, tal como na presente pesquisa, as células pulpares que permaneceram aderidas ao substrato de vidro após contato com os extratos obtidos do Vitrebond™ apresentavam morfologia arredondada e com perda parcial ou total dos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Estas observações também ocorreram para o Vitrebond™ Plus no período de 7 dias (grupo 3), o que mostrou claramente que ambos CIVMRs são solúveis e liberam componentes tóxicos quando presentes em ambiente com alta umidade. Todavia, redução menos intensa do número de células, as quais apresentavam, na sua maioria, morfologia semelhante àquela demonstrada para os grupos controle ocorreu para o grupo 3. Esta observação microscópica associada a limitada redução do metabolismo celular determinou que o Vitrebond™ Plus é menos solúvel que o seu antecessor e conseqüentemente apresenta, pelo menos de maneira inicial, menor efeito citopático para as células pulpares em cultura.

Além de menor efeito citotóxico inicial, o Vitrebond™ Plus apresenta também algumas vantagens quando comparado ao Vitrebond™ comum. Seu sistema de dispensador em forma de clicker facilita a manipulação do material, além de assegurar a quantidade ideal das duas porções, desenvolvendo uma mistura consistente com menor tempo de fotoativação. Estes fatores devem ser levados em consideração quando da seleção de um material ideal para forramento cavitário. Todavia, os resultados desta pesquisa inicial *in vitro* não podem ser de imediato extrapolados para *Upicultus noximpontidius et L. Scis vilissed* situações clínicas. Isto porque clinicamente ambos CIVMRs aqui avaliados são recomendados para forramento de cavidades, e sabe-se que a dentina atua como uma verdadeira

barreira biológica, conferindo proteção às células pulpares.²⁶ Assim, futuras pesquisas deverão ser realizadas com o objetivo de avaliar a possível difusão transdentária dos componentes liberados desses cimentos aplicados sobre discos de dentina de variadas espessuras e seus prováveis efeitos tóxicos sobre células de linhagem odontoblástica. Posteriormente, outras pesquisas serão necessárias para avaliar *in vivo*, a biocompatibilidade deste novo CIVMR.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa, foi possível concluir que o cimento de ionômero de vidro modificado por resina Vitrebond™ Plus apresentou reduzido efeito citotóxico inicial para as células em cultura quando comparado ao seu antecessor. Todavia, a dissolução tardia deste produto resultou em intenso efeito citopático para as células pulpares, tal como demonstrado para o Vitrebond™ em ambos períodos de análise.

REFERÊNCIAS

1. Geurtsen W, Lehmann F, Sphal W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resins composite monomer/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998;41:474-80.
2. Thonemann B, Schmalz G, Hiller K-A, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components *Dent Mater.* 2002;18:318-23.
3. Costa CAS, Hebling J., Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. *Dental Mater.* 2006;22:954-62.
4. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent,* 1999;27:557-564.

5. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D, Riccitiello, 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.
6. 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;77:2012-19.
7. Costa CAS, Hebling J, Godoy-Garcia F, Hanks CT. in vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomater.* 2003;24:3853-58.
8. Wilson AD, Kent BE. The glass-ionomer cement: a new translucent dental filling material. *J Appl Chem Biotechnol.* 1971;21:313-18.
9. Hurrell-Gillingham K, Reaney IM, Miller CA, Crawford A, Hatton PV. Devitrification of ionomer glass and its effect on the in vitro biocompatibility of glass-ionomer cements. *Biomater.* 2003;24:3153-60.
10. Walls AWG. Glass polyalkenoate (glass-ionomer) cements: a review. *J Dent.* 1986; 14:231-43.
11. Palmer G, Anstice HM, Pearson GJ. The effects of curing regime on the release of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) from resin-modified glass ionomer cements. *J Dent.* 1999;27:303-11.
12. Costa CAS, 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.* 2007;81:175-84.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;16 (65):55-63.
14. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsh M, Sapotnick A, Geurtsen W. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. *Biomaterials.* 1998;19(6):559-64. 15. Aranha AMF, Giro EM, 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;22:864-69.
16. Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;22:1-7.
17. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod.* 1996;22(5):244-8.
18. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988;67(11):1438-41.
19. About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(4):418-23.
20. Stanislawisk 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.
21. Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2001;91:230-34.
22. Oliva A, Ragione FD, Salerno A. Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomater* 1996;17:1351-56.
23. Geurtsen W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive and release variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers.

J Dent Res 1998;77:2012-19.

24. Consiglio R, Rengo S, Liguoro D. Inhibition by glass-ionomer cements of protein synthesis by human gingival fibroblasts in continuous culture. Arch Oral Biol 1998;43:65-71.
25. Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. Dent Mater 2007;23:688-95.
26. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. J Endod. 2005;31(5):396-9.