

INIBIÇÃO DO METABOLISMO DE CÉLULAS ODONTÓBLASTÓIDES INDUZIDA POR SISTEMAS ADESIVOS AUTOCONDICIONANTES

INHIBITION OF THE ODONTOBLAST-LIKE CELLS METABOLISM BY SELF-ETCHING ADHESIVE SYSTEMS

Célia Regina Moreira **LANZA***, Luiz Alberto lopes **JÚNIOR****, Lorena Brito de **SOUZA*****, Josimeri **HEBLING******, Carlos Alberto de Souza **COSTA*******

* Doutoranda em Clínicas Odontológicas, Área de concentração Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Profa Assistente da FO-UFMG e PUC-Minas.

** Bolsista de Iniciação Científica (CBPq) junto ao Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

*** Estagiária do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

**** Prof^a Adjunta do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

***** Prof. Adjunto do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Endereço para correspondência: Carlos Alberto de Souza Costa - Rua Humaitá 1680. Centro - CEP: 14.801-903 – CP: 331 - Araraquara – SP - Tel: (16) 3301-6477 / FAX: (16) 3301-6477 - E-mail: casouzac@foar.unesp.br

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Embora o aumento na concentração de monômeros ácidos tenha modificado o mecanismo de ação dos sistemas adesivos autocondicionantes, estes materiais resinosos contemporâneos ainda apresentam restrições biológicas. Componentes não polimerizados ou degradados com o tempo, devido ao aumento de sua característica hidrofílica, podem ser liberados e atingir as células da polpa causando efeitos tóxicos.

RESUMO

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos autocondicionantes sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Para o experimento, 30.000 células/cm² foram semeadas em compartimentos contendo meio de cultura (DMEM) completo e mantidas em cultura por 72 horas. Extratos dos adesivos dentinários Adper Prompt, Xeno III, AdheSE, Clearfil SE Bond (CSEB) e Clearfil Protect Bond (CPB) foram obtidos aplicando-se 5µL de cada sistema sobre discos de papel filtro. Após fotoativação por 10s, os discos foram imersos em DMEM por 24h. Tampão fosfato (TF) foi aplicado como grupo controle. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, o meio de cultura em contato com as células por 72 horas foi substituído pelos extratos experimentais e controle e mantidos em contato com as células por 4h. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT e a morfologia celular avaliada em MEV. Também o pH dos extratos foi determinado em um pHmetro digital. Em ordem decrescente, a redução do metabolismo celular causada pelo Adper Prompt, CPB, CSEB, Xeno III, e AdheSE foi de 92,45%, 86,39%, 80,22%, 14,69% e 10,11%, respectivamente, sendo que ausência de correlação entre citotoxicidade e pH foi observada. Exceto para o Xeno III e AdheSE, os demais agentes adesivos apresentaram redução do metabolismo celular estatisticamente significativa (Testes Mann-Whitney e

Kruskall-Wallis) quando comparado ao grupo controle (TF). Os adesivos autocondicionantes investigados apresentaram efeito citotóxico de variada intensidade, provavelmente modulado pelas diferenças em suas composições químicas e solubilidade em meio aquoso.

PALAVRAS-CHAVE: Adesivos dentinários; citotoxicidade; respiração celular

ABSTRACT

This study evaluated the cytotoxicity of contemporary self-etching adhesive systems on the immortalized odontoblast cell line MDPC-23. The cells (30.000 cells/cm²) were seeded in wells and incubated for 72 hours in complete culture medium (DMEM). Extracts of the adhesive systems Adper Prompt, Xeno III, AdheSE, Clearfil SE Bond and Clearfil Protect Bond were obtained by applying 5µL of each adhesive on round-shaped filter papers. After light-curing for 10 seconds, the filter papers with the bonding agents were immersed in DMEM for 24h. Phosphate buffer saline solution (PBS) was used as control group. Then, the experimental and control extracts were applied on the cultured cells and incubated for four additional hours and the pH of the extracts was determined. The cytotoxic effects were evaluated by the MTT assay and the cell morphology by SEM. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests demonstrated a significant difference among the bonding agents and the control group, except for Xeno III and AdheSE, which presented the lowest cytotoxic effects. Adper Prompt, conversely, was the most toxic material. The bonding agents Adper Prompt, Clearfil Protect Bond, Clearfil SE Bond, Xeno III, and AdheSE decreased the cell metabolic activity by 92.45%, 86.39%, 80.22%, 14.69% and 10.11%, respectively. No correlation was observed between pH of the extracts and the cytotoxicity. The resin-based materials caused variable cytotoxic effects, probably related to their particular chemical composition and solubility in wet environment.

KEY WORDS: Adhesive systems; cytotoxicity; cell respiration

INTRODUÇÃO

Os avanços nos conhecimentos dos mecanismos e fenômenos envolvidos na adesão dos materiais resinosos ao substrato dentinário têm exigido o desenvolvimento constante de novos produtos com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas. A geração mais recente de sistemas adesivos dentinários, denominados autocondicionantes, tem se tornado atrativa, devido ao fato de reduzir o tempo clínico e diminuir a sensibilidade à técnica, principalmente em relação aos inconvenientes do controle de umidade do substrato. Estes sistemas de união não requerem, como etapas do procedimento de aplicação clínica, o condicionamento ácido da dentina nem a posterior lavagem do agente condicionador.¹

Vários adesivos e primers autocondicionantes foram introduzidos no mercado odontológico, os quais contêm ácidos orgânicos insaturados ou monômeros ácidos polimerizáveis incorporados

em sua formulação. Estes, combinados com outros monômeros resinosos, fotoiniciadores e aminas terciárias aceleradoras, produzem diferentes efeitos condicionadores devido às variações de acidez e agressividade em relação à dissolução da smear layer e desmineralização da superfície de dentina subjacente². Tem sido demonstrado que os adesivos autocondicionantes de 2 passos são menos ácidos e de agressividade leve ou moderada (pH 1,5 a 3,0)². Quando comparados a estes materiais, os adesivos de frasco único são mais ácidos, apresentam hidrofília superior e contém maior quantidade relativa de solventes e diluentes em sua composição química. Uma vez que estes materiais não são lavados da superfície dentinária e podem apresentar comprometimento do grau de conversão monômero-polímero devido ao grande volume de água/solventes inerente a sua composição, sugere-se que os mesmos possam, eventualmente, favorecer um efeito condicionante contínuo na camada de dentina subjacente³. O aumento do número de

monômeros residuais não convertidos também pode comprometer sua propriedade biológica⁴.

O potencial tóxico dos componentes dos sistemas adesivos dentinários tem sido amplamente avaliado através de testes *in vitro*. Monômeros advindos de sistemas adesivos, especialmente aqueles componentes residuais não polimerizados, bem como bactérias e seus produtos, têm sido implicados como possíveis causas de irritação pulpar. Monômeros resinosos livres, tais como 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA), os quais são amplamente utilizados na composição química dos adesivos dentinários, podem causar efeitos tóxicos específicos sobre células pulpares⁵⁻⁸. Estes mesmos componentes, isolados ou combinados com resinas restauradoras, são capazes de se difundir através da dentina para alcançar a polpa dentária em concentrações que podem causar danos a este tecido conjuntivo especializado^{7,9-12}. Costa et al.⁵(1999) demonstraram a intensa citotoxicidade de sistemas adesivos convencionais simplificados em cultura de células pulpares. Os autores relataram que não apenas os monômeros residuais liberados, mas também a própria acidez dos materiais experimentais poderiam ter sido os fatores responsáveis pela notável redução do metabolismo celular e morte das células pulpares em cultura. Foi demonstrado também, que os efeitos citotóxicos se tornavam mais intensos quando os sistemas adesivos avaliados não eram submetidos à fotoativação. Neste mesmo ano, Geurtsen et al.¹³ (1999), analisaram extratos aquosos de vários agentes adesivos dentinários e mostraram citotoxicidade significativamente variável, a qual dependia diretamente da quantidade de componentes químicos, tais como TEGDMA, HEMA, comonômeros e reagentes iniciadores, presentes nos materiais resinosos investigados.

Nas últimas décadas, modelos *in vitro* que simulam o funcionamento do complexo dentino-pulpar foram desenvolvidos a fim de se investigar, em nível molecular, a resposta de células pulpares frente a diferentes estímulos¹⁴⁻¹⁹. Dentre esses modelos, os que têm maior reprodutibilidade de resultados são aqueles que utilizam células de linhagem odontoblástica mantidas em cultura. De acordo com McDougall et al.¹⁹ (1998), odontoblastos seriam as células

pulpares mais indicadas para se avaliar a citotoxicidade de materiais dentários aplicados sobre dentina. Isto porque, como estas células se organizam em camada para revestir internamente a dentina circumpulpar, passam a ser as primeiras a entrar em contato com componentes dos materiais que apresentam capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários, como ocorre com sistemas adesivos^{6,8}.

Desde que poucos são os dados científicos com relação aos efeitos citopáticos de sistemas adesivos autocondicionantes sobre células típicas da polpa, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar, de maneira preliminar e comparativa, a citotoxicidade desses materiais resinosos quando aplicados diretamente sobre células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Grupos experimentais

Seis grupos de investigação foram delineados no presente estudo, considerando-se cinco sistemas adesivos autocondicionantes (Adper Prompt, Xeno III, AdheSE, Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond), e a solução salina de tampão fosfato (grupo controle), os quais estão apresentados na Tabela 1.

2.2. Manutenção das células em cultura

As células imortalizadas odontoblastóides MDPC-23 (Mouse Dental Papilla Cells) foram mantidas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp, Cambridge, MA, USA) em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 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 3 dias até que se obtivesse o número celular suficiente para o desenvolvimento da pesquisa.

Para o experimento, 30.000 células/cm² foram semeadas na base de cada um dos 48 compartimentos (wells) de 2 placas de acrílico esterilizadas de 24 wells (Costar Corp.,

Cambridge, MA, USA). Nestes wells, 1mL de DMEM completo foi colocado sobre as células, as quais foram incubadas por 72 horas em atmosfera umedecida contendo CO² a 5% e na temperatura de 37°C e 95% de ar. Em 12 dos 48 wells, lamínulas de vidro esterilizadas de 12 mm de diâmetro foram posicionadas em sua base antes das células serem semeadas. Este procedimento permitiu que as células pudessem se aderir e proliferar sobre as lamínulas de vidro, as quais seriam posteriormente removidas para avaliação da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Decorridas 72 horas de incubação, as células aderidas diretamente na base dos compartimentos ou sobre as lamínulas de vidro foram expostas, pelo período de 4 horas, aos extratos obtidos dos materiais experimentais (Tabela 1).

2.3. Obtenção dos extratos dos adesivos

Para obtenção dos extratos dos materiais adesivos em estudo, foram utilizados 5 mL de cada sistema adesivo, aplicados sobre um filtro de papel esterilizado de 4 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura. Para os sistemas

autocondicionantes de 2 passos Clearfil SE Bond, Protect Bond e AdheSE, 2,5 mL de cada componente, primer e adesivo, foram aplicados consecutivamente. Para os sistemas de passo único, Xeno III e Adper Prompt, os componentes foram misturados antes da aplicação. Todos os materiais resinosos em estudo foram fotoativados por 10 segundos antes da colocação no fundo dos wells. Filtros de papel embebidos com 5 mL de tampão fosfato (TF) foram usados como grupo controle. Os filtros de papel com os agentes adesivos ou TF foram posicionados na base de 48 wells, onde foram fixados através da utilização de grampos metálicos específicos, preparados com fio ortodôntico 0,5. Em cada compartimento foi acrescentado 1mL de meio de cultura puro (DMEM). As placas de acrílico com os materiais imersos em DMEM foram mantidas por 24 horas em incubadora de CO² a 5%, com atmosfera umedecida e na temperatura de 37°C e 95 % de ar. Após esse período, o meio de cultura passou a representar os extratos, os quais foram utilizados para o ensaio de citotoxicidade.

2.4. Ensaio de citotoxicidade e morfologia

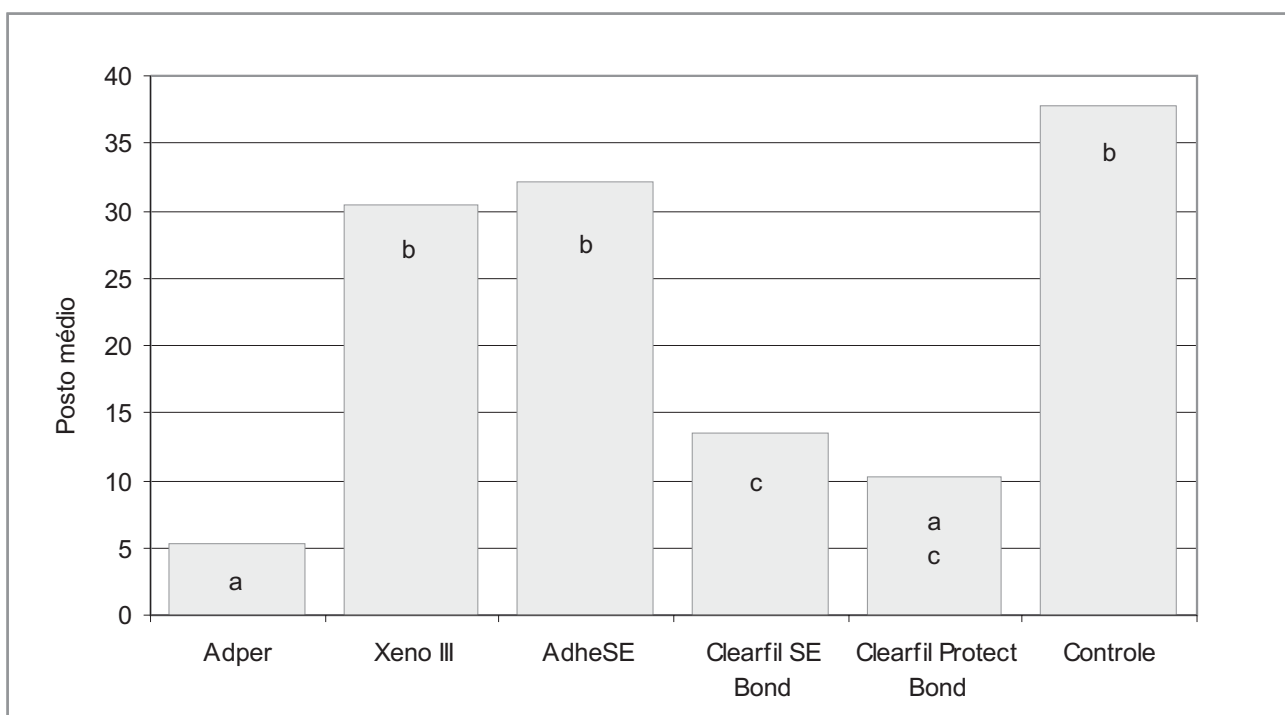


Figura 1 - Postos médios para a atividade da desidrogenase succínica (SDH) representativa do metabolismo celular (n=6). Colunas indicadas com letras iguais representam grupos estatisticamente não diferentes (Mann-Whitney, p 0,05).

Tabela 1- Sistemas adesivos (grupos experimentais) e principais componentes

Grupo Experimental	Componentes	Composição
Adper Prompt (3M/ESPE) - Passo único -	Blister A Blister B (pH: 0.8 - misturado)	Mono e di-HEMA fosfatos, dimetacrilato, CQ, amina aromática substituída e fenol substituído; Água, hidroximetilmetacrilato, ácido policarbônico de metacrilato e fenol substituído.
Xeno III (Dentsply) - Passo único -	Líquido A Líquido B (pH:1.0 - misturado)	HEMA, água, etanol, 2,6-di-tetrabutyl- <i>p</i> hidroxitolueno, BHT, nano-partículas; Piro-EMA-SK, PEM-F, UDMA, BHT, CQ, EPD, <i>p</i> -dimetil amina etil benzoato.
AdheSE (Ivoclar Vivadent) - Dois passos -	Primer (pH: 1,7) Adesivo (pH: 7,0)	Dimetacrilato, ácido fosfônico acrilato, bis(acrilamida), iniciadores, estabilizadores, água, CQ; Bis-GMA, GDMA, HEMA, sílica, CQ, amina terciária.
Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc.) - Dois passos -	Primer (pH: 1,9) Adesivo (pH: 2,8)	HEMA, dimetacrilato hidrofílico, 10-MDP, N,N-dietanol <i>p</i> -toluidina, CQ, água; Sílica silanizada, Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, 10-MDP, CQ, toluidina.
Clearfil Protect Bond (Kuraray Medical Inc.) - Dois passos -	Primer (pH: 1,9) Adesivo (pH: 2,8)	HEMA, dimetacrilato hidrofílico, 10-MDP, MDPB, água; Sílica silanizada, BisGMA, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, 10-MDP, toluidina, CQ, MDPB, fluoreto de sódio.
Tampão Fosfato (TF controle negativo)	(pH: 7.2)	Cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio, fosfato de potássio, água destilada

BHT: 2,6-di-tert-butyl-*p*-cresol; BPMD: bifênil dimetacrilato; CQ: canforoquinona; UDMA: uretano dimetacrilato; BisGMA: bisfenol-A diglicidil dimetacrilato; MDP: 10-metacrilóiloxi metacrilato; MPDB: 12-metacrilóiloxidodecil-piridinium brometo; HEMA: 2-hidroxi-etil metacrilato; PEM-F: Pentametacril-oxi-etil-ciclo-fosfazeno-monofluoreto; Pyro-EMA-SK: tetra-metacril-etil pirofosfato, GDMA: glicidil dimetacrilato.

celular

Para a avaliação dos efeitos citotóxicos dos agentes adesivos, o meio de cultura completo (DMEM), o qual permaneceu em contato com as células MDPC-23 por 72 horas, foi aspirado e imediatamente substituído pelos extratos experimentais e controle. As células, agora em contato com estes extratos, foram mantidas por 4 horas em incubadora de CO² a 5%, com atmosfera umedecida e na temperatura de 37°C e 95% de ar. Após este período de contato, a viabilidade celular foi mensurada pelo teste do metiltetrazolium (MTT assay) em 36 (6 para cada grupo) dos 48 wells. O teste de MTT quantifica a atividade metabólica celular através da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Naqueles 12 compartimentos com as lamínulas foram

posicionadas na sua base (2 para cada grupo), as células foram preparadas para análise de sua morfologia em MEV. As lamínulas dos compartimentos selecionados para este propósito foram fixadas por 24 horas em glutaraldeído a 2,5%, lavadas três vezes em PBS e pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio a 1%. Em seguida, as lamínulas foram novamente lavadas em PBS duas vezes, desidratadas em etanol com trocas a cada 30 minutos de concentrações ascendentes (30%, 50%, 70%, 95% e 100%), e finalmente imersas por 60 minutos (3 trocas de 20 minutos) em 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane 98% (HMDS, ACROS Organics, New Jersey, NY, USA). Após serem mantidos por 24 horas em dessecadora, os espécimes foram montados em stubs metálicos e cobertos com ouro para análise em microscópio eletrônico de varredura (DSM 940,

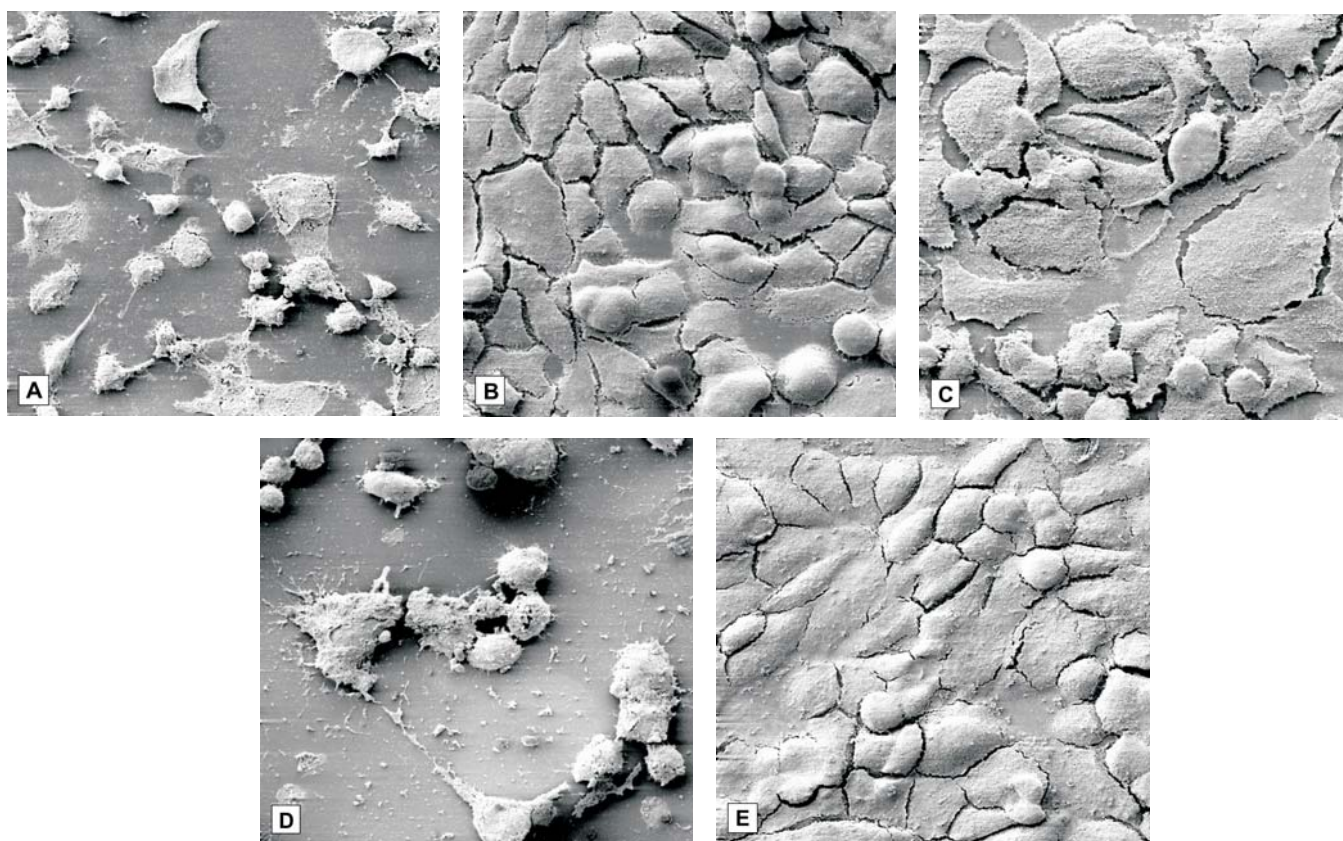


Figura 2 - Morfologia celular em MEV, 500x: (A) Adper Prompt e (D) Clearfil SE Bond: Poucas células permaneceram aderidas ao substrato, sendo que parte delas exibia morfologia arredondada. Note que alguns finos prolongamentos citoplasmáticos originados da membrana célula parecem manter a união das células à lamínula de vidro. (B) Xenon III, (C) AdheSE e (E) TF (controle negativo): Grande número de células MDPC-23 permaneceram aderidas ao substrato, caracterizando a confluência celular. Observe que as células exibem morfologia variada com amplo citoplasma espalhado sobre a lamínula de vidro, onde estas estão unidas.

Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.5. Análise do pH

Para a realização desta análise, foram preparados extratos de cada material como descrito anteriormente, cujo pH foi determinado através de um pHmetro digital (PG2000, GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil). O objetivo desta leitura foi correlacionar o possível efeito do pH dos extratos com os resultados de citotoxicidade determinados através do teste de MTT.

2.6. Análise estatística

Aos dados numéricos obtidos através da análise do metabolismo celular (MTT assay), foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pela análise de Mann-Whitney para a comparação múltipla dos grupos. Todos os testes foram considerados ao nível de significância de 5%. A redução do metabolismo celular foi computada a partir dos valores obtidos para o grupo controle, representativo de 100% de viabilidade celular.

RESULTADOS

Os postos médios obtidos dos valores de atividade da enzima desidrogenase succínica (SDH) através do teste de MTT, bem como os resultados dos testes estatísticos estão representados na Figura 1. Com exceção dos sistemas Xeno III e AdheSE, considerados os menos citotóxicos, todos os demais reduziram significativamente o metabolismo celular. Adper Prompt foi o material mais citotóxico, seguido do Clearfil Protect Bond e Clearfil SE Bond. A redução do metabolismo celular foi de 10,11% para AdheSE e 14,69% para o sistema Xeno III,

Tabela 2 - Valores de pH referentes aos extratos representados pelo meio de cultura (DMEM) recolhido após 24 h da imersão de discos de papel embebidos com os sistemas adesivos.

Sistemas Adesivos	pH
Adper Prompt	8,64
Xeno III	8,70
AdheSE	8,65
Clearfil SE Bond	8,74
Clearfil Protect Bond	8,76
Controle negativo (Tampão fosfato)	8,82

sem diferença estatística entre eles. Já para os sistemas Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond e Adper Prompt, a redução do metabolismo foi de 80,22%, 86,39% e 92,45% respectivamente.

Os valores de pH dos extratos obtidos após 24 h de imersão dos sistemas adesivos e TF em meio de cultura (DMEM) estão apresentados na Tabela 2. Foi possível determinar que nenhum extrato apresentou variação significativa de pH quando comparado ao valor demonstrado para o grupo controle (TF). Todos os extratos foram caracterizados como soluções alcalinas, demonstrando ausência de correlação entre pH e citotoxicidade dessas soluções.

A análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura demonstrou, para os sistemas Adper Prompt, Clearfil SE Bond e Protect Bond, severo efeito citotóxico dos extratos obtidos dos materiais experimentais sobre as células odontoblastóides. Para estes grupos, foi observada intensa morte celular direta, a qual foi caracterizada pela perda da maioria das células do substrato de vidro. As poucas células que permaneceram aderidas exibiam morfologia arredondada e com poucos prolongamentos celulares curtos originados de sua membrana (Figuras 2A e 2D). Já para os sistemas Xeno III e AdheSE (Figuras 2B e 2C), as alterações celulares foram menos significativas preservando-se sua morfologia quando comparadas ao grupo controle (Figura 2E). Para esses três últimos grupos, as células odontoblastóides MDPC-23 estavam próximas da confluência e organizadas em nódulos epitelióides. Estas células exibiam amplo citoplasma, responsável pela adesão celular ao substrato de vidro.

DISCUSSÃO

Numerosos estudos têm investigado a citotoxicidade de sistemas adesivos e seus componentes⁵⁻⁷⁻⁸⁻¹³⁻²⁰⁻²². A difusão transdentinária de componentes de sistemas convencionais pode reduzir a viabilidade de fibroblastos (L929) em até 71%²⁰. Da mesma forma, porém em menor magnitude, primers autocondicionantes também são tóxicos às células pulpares, resultando em redução de 26-35% na atividade metabólica celular²¹. Estas diferenças sugerem que a intensidade do dano celular é dependente da forma de tratamento do substrato dentinário,

e principalmente dos diferentes componentes químicos presentes nos sistemas adesivos. Isso foi observado no presente estudo uma vez que a amplitude da redução do metabolismo celular variou de 10,11% a 92,45% em função do material.

Desde que esses sistemas não são recomendados para aplicação direta sobre células pulpares, a obtenção de extratos é uma forma de simular uma situação onde apenas componentes solúveis poderiam ser liberados para causar danos celulares²³⁻²⁵. Embora o “teste de extrato” seja descrito como o menos sensível dentre os modelos utilizados para mensurar a citotoxicidade de materiais resinosos, uma vez que a quantidade de componentes dos materiais solúveis em ambiente líquido pode ser insuficiente para produzir efeitos citotóxicos²⁶, os resultados do presente estudo demonstraram que os sistemas adesivos investigados liberaram componentes em concentrações capazes de influenciar negativamente a respiração mitocondrial das células pulpares. O sistema Adper Prompt foi o mais agressivo para as células MDPC-23, juntamente com o Clearfil Protect Bond, seguido pelo Clearfil SE Bond. Por outro lado, os materiais Xeno III e AdheSE apresentaram os menores valores de redução da viabilidade celular e não foram estatisticamente diferentes do controle negativo (TF).

O pH dos extratos também foi avaliado com objetivo de correlacionar seu valor aos efeitos citotóxicos sobre as células em cultura, uma vez que todos os sistemas adesivos investigados apresentam pH ácido, embora com diferenças entre eles (Tabela 1). Entretanto, após o período de 24 h de contato do material com o meio de cultura (tempo de obtenção do extrato), todos os extratos apresentaram pH alcalino, semelhante ao valor de pH determinado para o meio de cultura em contato com o filtro de papel embebido em tampão fosfato (Tabela 2). A despeito do baixo valor de pH inicial dos sistemas adesivos puros, a aplicação de 5µL destes materiais sobre os discos de papel filtro e posterior imersão em 1mL de meio de cultura, não resultou em alteração significativa do pH do meio, provavelmente devido ao efeito de diluição dos íons hidrogênio. Assim, os valores de pH dos extratos não influenciaram os efeitos citotóxicos definidos para cada sistema adesivo investigado, determinando que a resposta celular estava

diretamente relacionada com os componentes químicos tóxicos dos materiais liberados no meio de cultura.

A intensidade dos efeitos citotóxicos induzidos por materiais resinosos diminui significativamente após fotoativação e remoção dos componentes superficiais não convertidos em polímeros devido à inibição causada pela presença de oxigênio⁸⁻²². O contato de células odontoblastóides com extratos de adesivos fotoativados sem a posterior remoção da zona inibida por oxigênio resultou em intenso efeito citopático. Por outro lado, a remoção dessa camada de monômeros residuais não reagidos por lavagem em tampão fosfato, resultou na redução drástica desses efeitos⁸. Embora exista um limite de conversão monômeros-polímero, inerente a cada material resinoso, o aumento do tempo de fotoativação atenuou a citotoxicidade de sistemas adesivos aplicados sobre fibroblastos da linhagem L929 devido a redução da concentração de monômeros liberados a valores quase indetectáveis e insuficientes para suprimir o crescimento ou inibir o metabolismo celular²². Isso reforça o fato de que os componentes não reagidos, particularmente os monômeros residuais, são os principais agentes químicos capazes de causar citotoxicidade por inibição da atividade metabólica celular e/ou indução de morte celular por apoptose ou por ação química direta⁵⁻⁸⁻²²⁻²³. Na presente pesquisa, todos os materiais foram fotoativados por 10 segundos utilizando-se uma unidade fotoativadora com intensidade de luz não inferior a 400 mW/cm², a qual era monitorada por radiômetro. Todavia, após fotoativação, os discos de papel embebidos com os materiais em teste não eram lavados, o que permitiu que todos os componentes superficiais solúveis, incluindo monômeros não convertidos em contato com o oxigênio, pudessem ser liberados no meio de cultura. Assim, a concentração dos componentes liberados dos adesivos autocondicionantes Adper Prompt, Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond foi suficiente para causar intenso efeito citotóxico sobre as células odontoblastóides, caracterizado pela redução do metabolismo celular em 92,45%; 80,22%; e 86,39, respectivamente.

Os adesivos autocondicionantes de passo único possuem menor grau de polimerização quando comparados aos de dois passos⁴.

Alguns fatores, tais como concentração relativa de água/HEMA, inclusão de fotoiniciadores no primer e tipo de solvente têm sido diretamente implicados no processo de polimerização e grau de conversão monomérica. Tem sido demonstrado que a extensão de polimerização do sistema adesivo Adper Prompt é inferior àquela observada para outros sistemas, como Clearfil SE Bond e Protect Bond por exemplo⁴. O menor grau de conversão pode acarretar em pequena resistência de união, alta susceptibilidade a degradação e também em continuidade da desmineralização dentinária, mesmo após fotoativação do agente adesivo²⁷. Da mesma forma, conversão insuficiente pode influenciar negativamente a biocompatibilidade⁴, o que poderia explicar o intenso efeito citotóxico determinado pelo sistema Adper Prompt no presente estudo, com redução do metabolismo celular em 92,45%. Em MEV foi observado um número reduzido de células ainda aderidas ao substrato, demonstrando que grande parte das células sofreram morte e deslocaram-se da superfície da lamínula de vidro (Figura 2A). Aspecto morfológico muito semelhante também foi observado para os sistemas adesivos Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond. Embora esses sistemas de dois passos tenham apresentado efeito citotóxico comparável, o último também foi estatisticamente não diferente do sistema Adper Prompt, resultando em redução de 86,39% do metabolismo celular. O ligeiro aumento de citotoxicidade do sistema Clearfil Protect Bond em comparação ao SE Bond, pode ser explicado pelo fato de que o primeiro não contém fotoiniciadores na composição de seu primer. Como demonstrado por Nunes et al.⁴ (2006), a presença de componentes fotossensíveis no primer representa uma das principais variáveis determinantes da evaporação água/solvente, o que em contrapartida, favorece o processo de polimerização. Outra diferença entre Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond é a presença do monômero antibacteriano MDPB (brometo de metacrilóiloxidodecílpiridínio) neste último. Entretanto, Imazato et al.²¹ (2000), investigando a citotoxicidade de materiais resinosos que empregam primers autocondicionantes ou primers experimentais que contém MDPB como monômero antibacteriano sobre células pulpares, demonstraram pequena diferença na redução do metabolismo celular quando

comparados aos primers que não contém esses monômeros. A difusão de pequena quantidade de monômeros ácidos promotores de adesão, como Phenyl-P e MDP, também pode ser responsabilizada pela citotoxicidade de sistemas autocondicionantes, sendo que a incorporação do MDPB no primer parece não influenciar seu comportamento tóxico²¹. Apesar de terem sido usadas metodologias diferentes, os resultados obtidos na presente pesquisa estão de acordo com os achados de Imazato et al.²¹ (2000), desde que os efeitos citotóxicos observados para o Clearfil Protect Bond não diferiram estatisticamente dos efeitos promovidos pelo Clearfil SE Bond, o qual não apresenta em sua composição química o agente antibacteriano MDPB.

Outro importante aspecto nos estudos de citotoxicidade está relacionado à estabilidade dos componentes dos materiais resinosos experimentais em meio aquoso, mesmo após polimerização. De maneira geral, a dissolução de adesivos resinosos polimerizados em meio aquoso pode atingir valores de 1,5-2,5% do seu peso total, dos quais, 5-10% são monômeros residuais não convertidos²². Com o objetivo de potencializar o efeito condicionante dos sistemas adesivos pela maior incorporação de monômeros resinosos ácidos, as formulações passaram a se tornar altamente hidrofílicas, o que resultou no significativo aumento da susceptibilidade destes materiais autocondicionantes, especialmente os de passo único, à degradação hidrolítica². Muitos dos monômeros amplamente usados na composição dos adesivos dentinários, tais como TEGDMA, Bis-GMA e UDMA são hidrofóbicos e não se difundem bem sob as condições aquosas encontradas in vivo. Quando usados em uma mistura com HEMA, a difusão desses monômeros pode ser facilitada porque o HEMA aumenta a característica de hidrofília do material. Sob estas condições, alguns monômeros hidrofóbicos podem atingir e lesar as células²². Isto foi comprovado por Hanks et al.¹¹ (1996), os quais relataram que a citotoxicidade in vitro de monômeros hidrofóbicos foi aumentada com a presença de HEMA na composição do material resinoso.

Na tentativa de solucionar as deficiências estruturais dos adesivos autocondicionantes, particularmente com relação à instabilidade

hidrolítica dos monômeros metacrilatos fosfatados utilizados como monômeros ácidos e a reação colateral dos componentes iniciadores aplicados nestes sistemas, modificações nas suas formulações têm sido constantemente realizadas. Inferior susceptibilidade à degradação hidrolítica tem sido demonstrada com a utilização de novos monômeros resinosos, incluindo os promotores de ligações cruzadas (cross-linkers)²⁸. Dos materiais avaliados na presente pesquisa, o sistema AdheSE apresenta em sua composição química monômeros com melhorada estabilidade hidrolítica, como o ácido fosfônico acrilato e acrilamidas²⁸. O mesmo pode ser especulado para o sistema Xeno III, uma vez que esse material apresentou resultados semelhantes ao AdheSE, embora não tenham sido encontrados na literatura estudos que comprovem esse fato. Estes dois sistemas adesivos autocondicionantes avaliados foram aqueles que apresentaram os menores efeitos citotóxicos sobre as células MDPC-23, reduzindo o metabolismo celular em 14,69% e 10,11%, respectivamente. A análise em MEV confirmou, através do número e características morfológicas das células aderidas ao substrato de vidro, o discreto efeito citotóxico desses sistemas. Embora Xeno III, a semelhança do sistema Adper Prompt, seja um sistema autocondicionante de passo único, a evaporação do etanol usado como solvente é mais facilmente promovida. Isso pode ter favorecido a conversão monomérica quando comparado ao Adper Prompt, o qual contém apenas água como solvente⁴, embora esses sistemas apresentem inferior grau de conversão quando comparados, por exemplo, ao Clearfil Protect Bond²⁹.

Por fim, para que seja possível afirmar definitivamente, qual a concentração de componentes não reagidos e/ou degradados hidroliticamente e liberados no extrato, assim como quais substâncias são as responsáveis diretas pelos efeitos citotóxicos causados às células de linhagem odontoblástica MDPC-23, é necessário determinar e quantificar, através de protocolos específicos, a presença destes componentes no meio. Desta forma, novos estudos são necessários e certamente complementarão os dados científicos obtidos nesta pesquisa.

CONCLUSÃO

Foi possível concluir, dentro das condições experimentais deste estudo, que os adesivos dentinários autocondicionantes Adper Prompt, Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond apresentaram intenso efeito citotóxico sobre células pulpares MDPC-23, caracterizado por morte e notável alteração na morfologia celular. Por outro lado, os sistemas adesivos Xeno III e AdheSE foram aqueles que causaram menores danos às células, sendo que o efeito citotóxico observado para ambos materiais foi discreto.

REFERÊNCIAS

1. Carvalho RM, Carrilho MRO, Pereira LCG, Garcia FCP, Marquezini Jr L, Silva, SMA et al. Sistemas adesivos: fundamentos para aplicação clínica. *Biodonto* 2004;2(1):45-57.
2. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2001;17(4):296-308.
3. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials* 2005;26(9):1035-1042.
4. Nunes TG, Garcia FCP, Osorio R, Carvalho RM, Toledano M. Polymerization efficacy of simplified adhesive systems studied by NMR and MRI techniques. *Dent Mater.* 2006; In Press.
5. 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(6):434-41.
6. Hebling J, Giro EM, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999;27(8):557-64.
7. Bouillaguet SJ, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. *J Endod.* 1996;22(5):244-8.
8. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent.* 2003;28(4):365-70.
9. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Straw SE,

Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentine. *J. Oral Rehabil.* 1994;21(4):475-87.

10. Gerzina TM, Hume WR. The diffusion of monomers from bonding resin-composite combinations through dentine in vitro. *J Dent.* 1996;24(1-2):125-128.

11. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* 1996;12(3):186-193.

12. Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *J Oral Rehabil.* 1997;24(1):20-25.

13. Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *J Biomed Mater Res.* 1999;48(6):772-7.

14. Shteyer A, Gazit D, Binderman I, Bab IA. Hormone-responsive cells derived from human dental papilla: characterization in vitro and in vivo in diffusion chambers. *In vitro Cell Dev Biol.* 1987;23(1):15-20.

15. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in an in vitro device. *J Oral Pathol.* 1988;17(8):369-403.

16. Kasugai S, Adachi M, Ogura H. Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1988;33(12):887-91.

17. Kawase T, Orikasa M, Suzuki A. A clonal prostaglandin-responsive cell line (RDP 4-1) derived from rat dental pulp. *Bone Miner.* 1990;11(2):163-75.

18. Kikuchi H, Sawda T, Yanagisawa T. Effects of a functional agar surface on in vitro dentinogenesis induced in proteolytically isolated, agar-coated dental papillae in rat mandibular incisors. *Arch Oral Biol.* 1996;41(8/9): 871-83.

19. MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Carnes DL. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J Dent* 1998; 11(special issue): S11-6.

20. Camps J, Tardieu C, Déjou J, Franquin JC, Ladaïque P, Rieu R. In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. *Dent Mater.* 1997; 13(1): 34-42.

21. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental

antibacterial primers. *J Dent.* 2000; 28(1): 61-7.

22. 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(4): 333-9.

23. 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(12): 2012-19.

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

25. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand.* 1999 Dec; 57(6): 316-22.

26. 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(2): 101-8.

27. Oliveira SSA, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky AS, Wilson RS, Marshall Jr GW. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentine. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(4): 376-83.

28. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater.* 2005; 21(10): 895-910.

29. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(6): 525-30.