

# **CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO RESTAURADORES SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA.**

Luciana Rocha Coimbra, Elisa Maria Aparecida Giro, Andreza Maria Fábio Aranha, Carlos Alberto de Souza Costa. – Odontologia – Odontologia – Departamento de Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia – Campus de Araraquara.

Introduzidos por Wilson e Kent<sup>8</sup> no ano de 1972, os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) têm sido amplamente utilizados na Odontologia como forradores cavitários, selantes de fissuras e materiais restauradores. A razão para o interesse dos pesquisadores neste cimento deve-se a algumas importantes propriedades inerentes a este tipo de material, tais como efeito cariostático e remineralizador devido à liberação de flúor (EXTERKATE et al.<sup>2</sup>, 2005) e adesão química ao esmalte e à dentina (ERICKSON e GLASSPOOLE<sup>1</sup>, 1994). De acordo com Gandolfi et al.<sup>3</sup> (2005), a liberação de flúor depende da degradação do ionômero de vidro causada pelo pH do meio, sendo que em ambientes com baixos valores de pH ocorre uma maior liberação de flúor. Dessa forma, esse material exerce um importante papel naqueles pacientes que apresentam saliva com pH baixo e alto risco à cárie.

Os cimentos de ionômero de vidro podem ser classificados de acordo com a sua composição química como convencionais (CIVCs) ou modificados por resina (CIVMRs). Os CIVCs são caracterizados pela reação química de um pó de flúor-alumínio silicato de vidro com uma solução aquosa de polímeros ácidos. Por outro lado, nos CIVMRs foram incorporados monômeros hidrofílicos, tais como o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) e iniciadores de polimerização, aos componentes dos CIVCs (WILSON<sup>7</sup>, 1990). Apesar da melhora nas propriedades mecânicas, os efeitos citotóxicos dos CIVMRs parecem ser mais evidentes quando comparados àqueles dos CIVCs (LAN et al.<sup>5</sup>, 2003).

Considerando as diferenças de composição entre os CIVCs e os CIVMRs e, baseado no fato de que os odontoblastos são as primeiras células da polpa afetadas por componentes de materiais que apresentam capacidade de difusão transdentinária, o objetivo desta pesquisa foi analisar o comportamento de células de linhagem odontoblástica quando expostas aos produtos liberados por estes materiais ionoméricos.

Para a realização deste estudo, foram utilizados dois cimentos de ionômero de vidro para restauração, um convencional (Ketac Fil Plus - 3M/ESPE, St. Paul, USA) e um modificado por resina (Fuji II LC – GC, Tokyo, Japan). Como controle negativo foi usado o próprio meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - SIGMA Chemical CO., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

Os materiais experimentais foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes e foram confeccionados corpos de prova padronizados de 2mm de altura por 4 mm de diâmetro. Imediatamente após a presa, os corpos de prova permaneceram em estufa com 100% de umidade a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, cada corpo de prova foi posicionado na base de compartimentos (*wells*), onde foi aplicado 1,1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino (DMEM–SFB). Após 24 horas de manutenção dos corpos de prova imersos em DMEM–SFB, esta solução contendo os produtos liberados pelos materiais em teste, teve o pH ajustado para 7,4, foi filtrada em filtro de 0,22 µm (Sterile Syringe Filter, Corning<sup>R</sup>, NY 14831, Germany) e suplementada com 10% de soro fetal bovino, caracterizando o extrato final dos materiais, o qual foi aplicado diretamente sobre as células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 (HANKS et al.<sup>4</sup>, 1998).

Para avaliação do metabolismo das células em contato com os extratos obtidos dos materiais ionoméricos em estudo, 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado, contendo  $6 \times 10^4$  células MDPC-23 foi introduzido em cada *well* de uma placa esterilizada para cultura de células de 24 *wells* (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Esta placa foi mantida por 48 horas em incubadora com 100% de umidade à 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Em seguida, o meio de cultura em contato com as células foi aspirado e substituído pelos extratos dos materiais experimentais ou do grupo controle. Oito *wells* foram utilizados para cada extrato obtido, sendo que estas soluções experimentais e controle foram incubadas em contato com as células MDPC-23 pelo período adicional de 24 horas.

Decorrido este período, para a determinação do metabolismo celular foi utilizado o teste colorimétrico do MTT, o qual determina a taxa de respiração mitocondrial das células (MOSMANN<sup>6</sup>,

1983). A densidade ótica da solução foi avaliada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader- BIO-TEK Instruments, ICC, USA), num comprimento de onda de 570nm para 3 aliquotas de cada amostra.

Dois wells representativos de cada grupo experimental e controle foram preparados para análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de varredura. Para isto, lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) foram esterilizadas e posicionadas no fundo dos *wells* imediatamente antes das células MDPC-23 serem semeadas. Assim, após a incubação das células em contato com os extratos experimentais e controle, estes foram aspirados dos *wells*, sendo que as células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro posicionado na base dos *wells* foram fixadas por uma hora com 1mL de glutaraldeído a 2,5% e, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por mais uma hora. Em seguida, procedeu-se a desidratação através de trocas periódicas de soluções de etanol em concentrações crescentes. Finalmente, as células aderidas às lamínulas de vidro foram submetidas ao tratamento com a solução 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane 98% (HMDS – Across Organics, New Jersey, USA). Então, as lamínulas de vidro, com as células sobre a superfície, foram removidas da base dos *wells*, fixadas em *stubs* de aço, os quais foram mantidos em dessecador por 12 horas. Decorrido este período, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Zeiss, West Germany) para determinação da morfologia celular.

Os dados referentes ao metabolismo celular apresentaram distribuição não normal e foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual mostrou não existir diferença significativa entre os materiais estudados ( $p>0,05$ ), com relação ao metabolismo celular (Gráfico1).

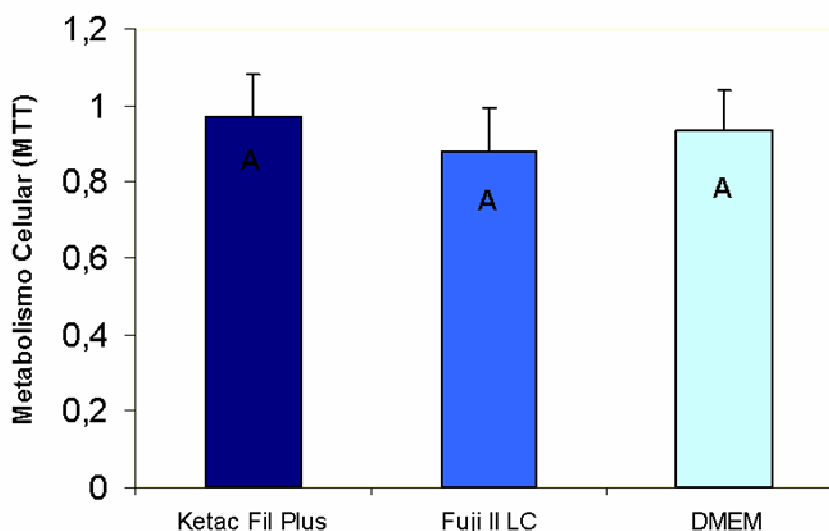
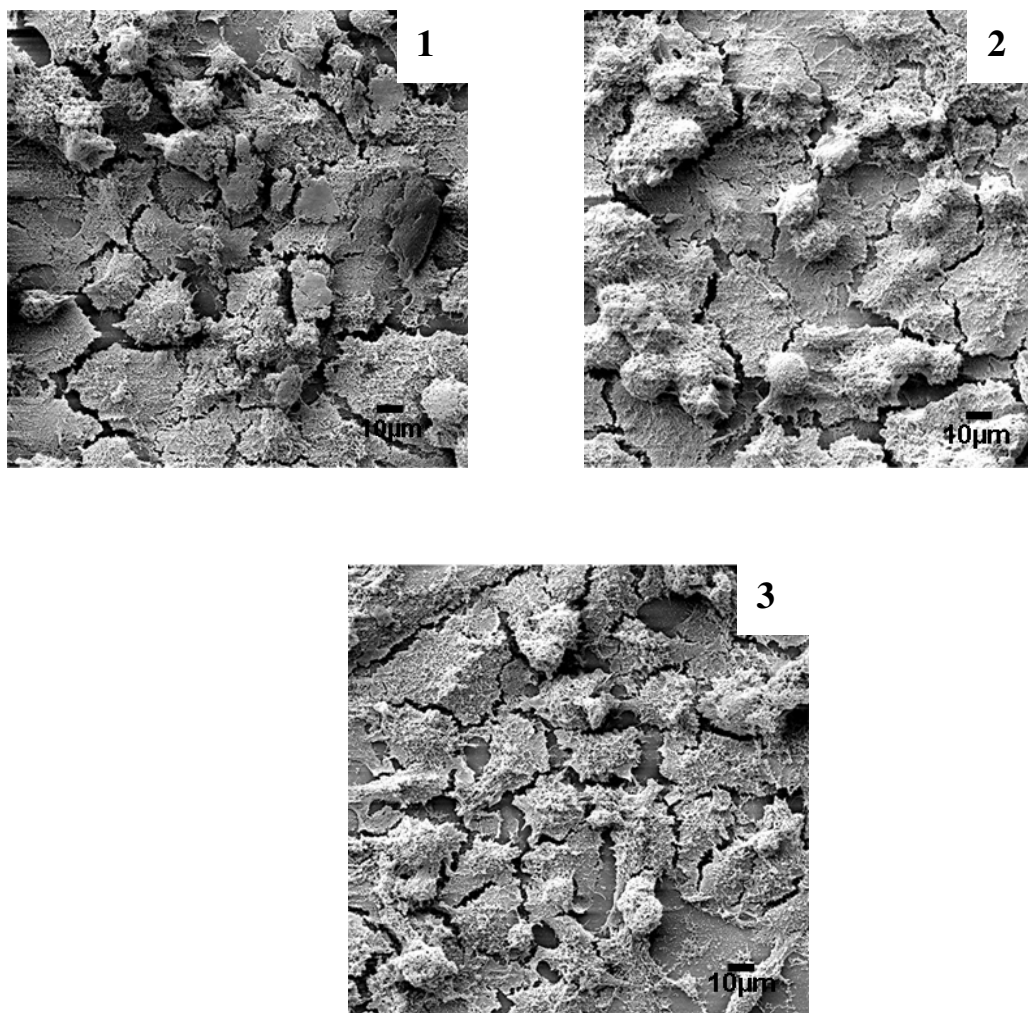


Gráfico 1 – Metabolismo celular (MTT) segundo os materiais estudados. Colunas com letras iguais apresentam resultados estatisticamente semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p>0,05$ ). Barras correspondem a um desvio padrão.

Na análise da morfologia celular o grupo controle negativo (DMEM) mostrou grande número de células MDPC-23 sobre as lamínulas de vidro. Morfologicamente, estas células apresentavam-se ligeiramente alongadas e com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos, os quais pareciam aderi-las ao substrato de vidro (Figura 1). Grande número de células com morfologia semelhante àquela das células do grupo controle também foi observado para os dois grupos experimentais avaliados (Figuras 2 e 3).

Dentro das condições experimentais deste trabalho foi possível concluir que os materiais ionoméricos avaliados apresentaram baixo efeito citotóxico para as células de linhagem odontoblástica MDPC-23.



Figuras 1 (Grupo controle – DMEM), 2 (Ketac Fil Plus), e 3 (Fuji II LC) - Presença de grande número de células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro. Note que estas células apresentam múltiplos prolongamentos citoplasmáticos originados de suas membranas. Pequenas células arredondadas caracterizam a finalização do processo de mitose no local (MEV, 500X).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ERICKSON, R.L.; GLASSPOOLE, E.A. Bonding to tooth structure: a comparison of glass-ionomer and composit-resin systems. **J. Esthet. Dent.**, Philadelphia, v.6, n.5, p.227-244, 1994.
2. EXTERKATE, R.A.; DAMEN, J.J.; TEN CATE, J.M. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. **Caries Res.**, Basel, v.39, n.6, p.509-513, Nov./Dec. 2005.

3. GANDOLFI, M.G.; CHERSONI, S.; ACQUAVIVA, G.L.; PIANA, G.; PRATI, C.; MONGIORGI, R. Fluoride release and absorption at different pH from glass-ionomer cements. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 441-449, May 2006.
4. HANKS, C. T.; SUN, Z.L.; FANG, D. N.; EDEARDS, C.A.; WATAHA, J.C.; RITCHIE, H.H. et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. **Connective Tissue Res.**, London, v.37, n.3/4, p.233-249, 1998.
5. LAN, W. H.; LAN, W.C.; WANG, T.M.; LEE, Y.L.; TSENG, W.Y.; LIN, C.P.; JENG, J.H.; CHANG, M.C. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. **Oper. Dent.**, Seattle, v. 28, n. 3, p. 251-259, May/June 2003.
6. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.
7. WILSON, A. D. Resin-modified glass-ionomer cements. **Int. J. Prosthodont.**, Lombard, v.3, n. 5, p. 215-219, Sept./Oct. 1990.
8. WILSON, A.D.; KENT, B.E. A new translucent cement for dentistry: The glass-ionomer cement. **Br. Dent. J.**, London, v.132, n.4, p.133-135, Feb. 1972.