

## **INFLUÊNCIA DO TEMPO DE PRESA E DA UMIDADE SOBRE A CITOTOXICIDADE DO AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA BRANCO).**

Patrícia Gonçalves Frederico, Carlos Alberto de Souza Costa, Célia Regina Moreira Lanza, Josimeri Hebling. – Odontologia – Departamento de Fisiologia e Patologia – Faculdade de Odontologia – Campus de Araraquara.

Desde o desenvolvimento da primeira formulação do cimento MTA (Agregado de Trióxido Mineral), este material tem sido utilizado para variados procedimentos clínicos<sup>4</sup>. Atualmente, um novo agregado de trióxido mineral está sendo produzido no mercado nacional, o MTA-Branco (ANGELUS Indústria de Produtos Odontológicos Ltda, Londrina, PR, Brasil), o qual apresenta custo inferior aos demais cimentos importados. O propósito da presente pesquisa foi avaliar, *in vitro*, os efeitos da reação de presa do cimento MTA-Branco (ANGELUS) e do tempo de extração de seus componentes em meio de cultura, quando aplicado diretamente sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

Células de linhagem odontoblástica MDPC-23<sup>2</sup> foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm<sup>2</sup> (Costar Corp, Cambridge, MA, USA) em meio de cultura completo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB-Cultilab, Campinas, SP, BR), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina e 2mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C. Estas células foram sub-cultivadas a cada 3 dias até que se obtivesse o número de células suficientes para a realização do experimento (30.000 células/cm<sup>2</sup>) e após serem incubadas por 72 horas foram expostas aos extratos obtidos do cimento MTA-Branco.

O metabolismo das células odontoblastóides que mantiveram contato com os extratos do MTA-Branco (Grupos 1, 2, 3 e 4 – Tabela 1) foi avaliado por meio da análise colorimétrica do Metiltetrazolium (teste do MTT)<sup>5</sup>, a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células. Este protocolo tem sido amplamente utilizado em pesquisas realizadas com culturas de células<sup>1,3,6,7</sup>. A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (ELX 800 - Universal Microplate Reader-BIO-TEK Instruments, ICC), num comprimento de onda de 570nm. Neste estudo, 32 corpos de prova foram confeccionados com o MTA-Branco (ANGELUS Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil), os quais foram divididos (n = 8) de acordo com o tempo de presa do material (1 hora ou 4 horas) e o período em que os espécimes foram mantidos em contato com o meio de cultura DMEM (24 horas ou 7 dias). A identificação e o número de espécimes de cada grupo estão apresentados na Tabela 1. Os valores de pH das soluções experimentais e controle foram avaliados através da utilização de um phmetro digital (PG 2000, GEHAKA, São Paulo, SP). A leitura foi realizada inicialmente no meio DMEM puro e em seguida, nas soluções obtidas após a manutenção dos corpos de prova do MTA-Branco em DMEM puro. A morfologia das células MDPC-23 foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – USA Inc., Peabody, MA, USA) utilizando dois espécimes representativos de cada grupo. Para isto, as células em contato com os extratos experimentais ou com o meio de cultura (controle), após os 120 minutos de incubação, foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% por 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 60 minutos. Em seguida, foram desidratadas em soluções de etanol em concentrações crescentes e finalmente, as células foram submetidas à secagem por meio do solvente de baixa tensão superficial 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, New Jersey, USA) e mantidas em dessecador durante 12 horas.

Os resultados numéricos de metabolismo celular após 120 minutos de contato das células MDPC-23 com os extratos experimentais e solução controle foram submetidos à análise estatística de Mann-Whitney (p > 0,05). A análise estatística demonstrou não existir diferença quanto ao metabolismo celular entre os Grupos experimentais e destes com os Grupos controle como demonstrado na Tabela 2 e Figura 1. Independente do tempo de presa do material (1 ou 4 horas) e do período do tempo de obtenção dos extratos (24 horas ou 7 dias), o MTA-Branco praticamente não apresentou efeitos tóxicos sobre as células MDPC-23. Nos Grupos 1, 2, 3 e 4, a redução do metabolismo celular causada pelo cimento experimental

foi de 0,82%; 9,6%; 4,4% e 0%, respectivamente. Os valores obtidos para os Grupos 5 e 6 (controle) foram considerados 100% do metabolismo celular, ou seja, ausência de inibição do metabolismo das células (0% de redução do metabolismo das células). Os valores de pH obtidos mostraram baixa variação entre eles e estão representados na Tabela 3. Através da análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi observado para todos os grupos experimentais e controle, que uma grande quantidade de células MDPC-23 permaneceu aderida ao substrato de vidro. Estas células se apresentavam organizadas em nódulos, sendo que a morfologia da maioria delas era alongada e com finos prolongamentos citoplasmáticos, os quais pareciam promover a adesão das mesmas às lamínulas de vidro (Figuras 2, 3, 4).

Dentro das condições experimentais, foi possível concluir que o tempo de presa e de armazenagem do cimento MTA-Branco em ambiente úmido não interferiram negativamente no metabolismo celular, caracterizando o baixo efeito citotóxico do material. Portanto, os excelentes resultados observados na presente pesquisa, caracterizados pela limitada citotoxicidade do MTA-Branco sobre células pulpares em cultura, devem encorajar o desenvolvimento de novas investigações com o objetivo de avaliar a resposta de polpas expostas capeadas com este material odontológico.

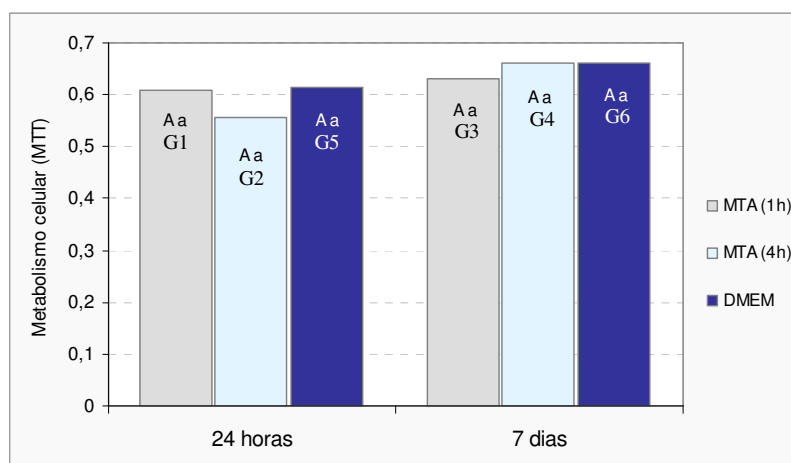
**Tabela 1.** Distribuição dos Grupos Experimentais e Controle de acordo com o tempo de armazenagem dos corpos de prova no meio de cultura.

MATERIAL	TEMPO DE ARMAZENAMENTO	TEMPO DE PRESA	IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS	NÚMERO DE ESPÉCIMES
MTA (ANGELUS Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil).	24 horas	1 hora	G1	8
		4 horas	G2	8
	7 dias	1 hora	G3	8
		4 horas	G4	8
DMEM (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA).	24 horas	—	G5	8
	7 dias	—	G6	8

**Tabela 2.** Médias e desvios-padrão do metabolismo das células MDPC-23 em contato com os extratos experimentais.

Período	MTA		DMEM
	1 hora presa	4 horas presa	
<b>24 horas</b>	<b>G1</b> - 0,610 (0,082) A,a*	<b>G2</b> - 0,556 (0,073) A,a	<b>G5</b> - 0,615 (0,113) A,a
<b>7 dias</b>	<b>G3</b> - 0,631 (0,027) A,a	<b>G4</b> - 0,662 (0,129) A,a	<b>G6</b> - 0,660 (0,050) A,a

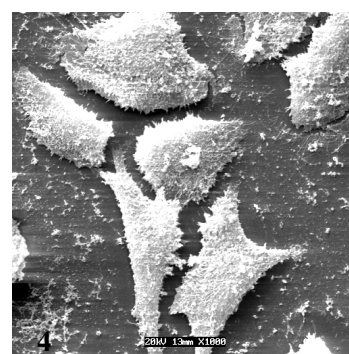
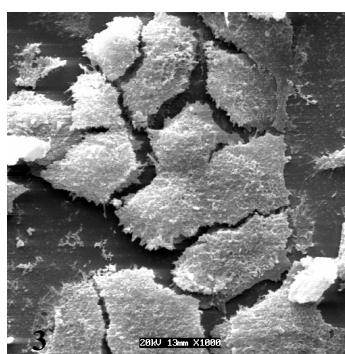
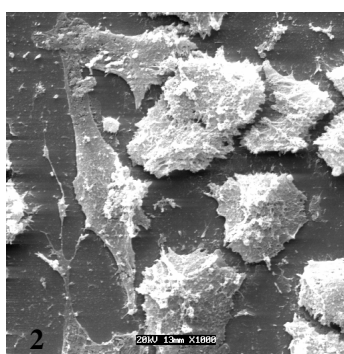
\*Médias seguidas por letras iguais minúsculas nas linhas e letras maiúsculas nas colunas são estatisticamente iguais (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** Representação gráfica do metabolismo das células MDPC-23 em contato com o MTA-Branco, de acordo com o período de armazenamento no meio de cultura e o tempo de presa.

**Tabela 3** - Valores de pH dos extratos experimentais e do controle.

Período	Valores de pH MTA		DMEM
	1 hora presa	4 horas presa	
24 horas	8,98	8,90	8,85
7 dias	8,99	8,42	8,47



**Figura 2.** Grupo controle 24h (G5) – Células MDPC-23 organizadas em nódulos, aderidas ao substrato de vidro. Note a presença de células com longos e finos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. **Figura 3.** Grupo MTAB 1h/7 dias (G3) – Mesmo neste grupo experimental, as células MDPC-23 se mantiveram organizadas em nódulos e com morfologia plana. **Figura 4.** Grupo MTAB 4h/ 7 dias (G4). Presença de células ligeiramente alongadas e organizadas em nódulos. Note a interação das células com o substrato através de finos prolongamentos citoplasmáticos.

## Referências Bibliográficas

01. Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomater* 2003;24:3853-8.
02. Hanks CT et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connective Tissue Res.* 1998; 37 (3-4):233-249.
03. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 1998; 24(8):543-7.
04. Lee SJ; Monsef M; Torabinejad M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
05. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
06. Souza PPC; Aranha AMF, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 838-44.
07. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int. Endod. L.* 2006; 39: 415-422.

**Bolsa:** PIBIC/CNPq