

TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS SELADORES DE CANAIS RADICULARES EM GERMES DENTAIS *IN VITRO**

Sebastião HETEM**

Claudia Misue KANNO***

Maria Tereza Girotto MATHEUS****

- **RESUMO:** Germes dentais de primeiros molares inferiores de fetos de camundongos com 14 ou com 17 dias foram cultivados *in vitro* na presença da Sealapex, CRCS, AH-26 ou de óxido de zinco e eugenol, durante 6 dias. Os materiais odontológicos foram testados 24 horas após a sua manipulação, ou 15 dias após a sua preparação e incubação em meio de cultura em estufa de CO₂, a 37C°; neste último caso, foram testados tanto os materiais odontológicos quanto o meio onde eles ficaram incubados. Todos os materiais analisados mostraram-se incompatíveis com o desenvolvimento dos germes dentais nestas condições de experimentação. Os germes dentais obtidos dos animais mais jovens foram mais resistentes que os obtidos dos animais mais velhos. O meio de cultura, onde os discos dos materiais odontológicos ficaram depositados, apresentou resultados melhores que os experimentos que empregaram os discos propriamente ditos, quer 24 horas após a sua preparação quer após o período de incubação em meio de cultura por 15 dias, sugerindo que a liberação de substâncias tóxicas para o meio é constante na presença dos discos, mas que as mesmas se dissipam na sua ausência.
- **UNITERMOS:** Materiais biocompatíveis; materiais restauradores do canal radicular; germe de dente.

Introdução

Após a observação de que materiais odontológicos podem ser testados quanto à sua biocompatibilidade *in vitro*,⁶ um vasto campo de estudo abriu-se a pesquisas dessa natureza.

* Trabalho subvencionado pela FAPESP - Proc. (89/3958-0).

** Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 14801-903 - Araraquara - SP (Bolsista do CNPq - Proc. 301761/85-0(RE)).

*** Estagiária - Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 16015-050 - Araçatuba - SP.

**** Departamento de Morfologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 16015-050 - Araçatuba - SP.

Assim, testes de biocompatibilidade *in vitro* tornam-se desejáveis, não só com vistas a melhor reprodutividade das condições de trabalho, como também pelas novas luzes que trarão nesse outro nível de conhecimento.

Muitos testes de biocompatibilidade, utilizando sistemas de culturas de células, têm conduzido a resultados inconsistentes.¹⁴

A maneira de expor os materiais aos tecidos influi de modo significativo sobre os efeitos observados^{9,13} e sobre a utilização de um sistema de meio de cultura definido,¹⁰ além de padronizar a metodologia de trabalho, possibilita a análise dos materiais após a sua manipulação ou de partes desses materiais ou, ainda, suas frações solúveis.

Este trabalho propõe-se a estudar, de três maneiras diferentes, a biocompatibilidade *in vitro* de materiais odontológicos utilizados como seladores de canais radiculares e germes dentais de molares de camundongos.

Material e método

Camundongos albinos foram cruzados e o aparecimento do *plug* vaginal foi considerado o dia zero da gestação. Após 14 ou 17 dias de gestação, as mães foram sacrificadas, os úteros assepticamente removidos e os embriões dissecados e colocados em solução de Tyrode.

Os embriões foram decapitados sob a ação de uma capela de fluxo laminar, as cabeças foram colocadas em uma nova solução de Tyrode e os primeiros molares inferiores dissecados e colocados em meio MEM-Eagle para cultura.

Os germes dentais foram colocados sobre uma peça de papel "millipore", de forma retangular, que, por sua vez, foi colocada sobre um segmento de tela metálica apoiada nas bordas do frasco de cultura. Foi colocado meio de cultura até aproximadamente a altura da metade dos germes dentais. Cada um desses conjuntos foi colocado no interior de uma placa de Petri descartável e incubado, durante seis dias, em uma estufa com atmosfera umidificada e 5% de CO₂, a 37°C.

Quatro materiais seladores de canais radiculares foram testados: Sealapex, AH-26, CRCS e óxido de zinco e eugenol. Os materiais foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e condensados em um molde de silicone para formar um disco de 1,6 mm de diâmetro por 1,0 mm de espessura. O material foi colocado em uma estufa a 37°C por 24 horas até que tomasse presa; o Sealapex necessitou de 3 dias para endurecer nessas condições de trabalho. Decorrido o tempo necessário para o endurecimento dos materiais, os discos foram desinfetados em álcool 70% durante 2 minutos e deixados secar em uma capela de fluxo laminar. Os materiais foram testados de três maneiras diferentes: uma dessas maneiras foi a colocação dos discos, após o período de presa, no meio de cultura no qual os germes foram cultivados; uma segunda maneira foi a colocação dos discos de materiais odontológicos em recipientes (placas de Petri) contendo meio de cultura na proporção de 1 ml para cada disco e a

utilização desses discos após decorrido um período médio de 15 dias de incubação em estufa; e na terceira maneira, foram cultivados germes dentais no líquido onde os discos ficaram depositados durante 15 dias; neste último caso, os meios foram enriquecidos com 1% de glutamina no momento da incubação dos germes na estufa de CO₂.

Germes dentais foram cultivados em meio MEM-Eagle, sem a presença de discos de materiais odontológicos, como espécimes controle.

O meio de cultura foi renovado a cada 2 dias e, após o período de 6 dias, os germes foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados com 6 µm de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina para análise em microscopia óptica.

Resultado

Germes dentais com 14 dias

Controle

Os germes dentais, obtidos de fetos com 14 dias e cultivados por 6 dias em meio controle, apresentavam-se em fase inicial de campânula. Neles podiam se distinguir as estruturas epiteliais que formavam um órgão do esmalte bem-desenvolvido, com os epitélios interno e externo bem-definidos e células indiferenciadas, uniformemente distribuídas entre elas. À frente da concavidade formada pelo órgão do esmalte, as células da papila começavam a se organizar na camada odontoblástica. As demais células da papila distribuíam-se uniformemente e não apresentavam qualquer grau de diferenciação. Paralelamente à superfície do órgão do esmalte, havia poucas fileiras de células alinhadas, acompanhando essa superfície (Figura 1).

Tratados

Sealapex

Os germes dentais cultivados durante 6 dias em meio contendo Sealapex, quer logo após a sua preparação quer após 15 dias com os discos ou no meio de cultura onde os discos ficaram depositados, apresentavam-se absolutamente sem características estruturais de germes dentais. As células epiteliais permitiam vislumbrar o que havia sido o órgão do esmalte, particularmente quando cultivados no meio onde os discos ficaram incubados, entretanto, as estruturas da papila e do saco dentais não mostravam características de vitalidade (Figura 2).

Os germes dentais cultivados durante 6 dias em meio contendo AH-26, da mesma forma que ocorreu quando se usou Sealapex, nas três condições de trabalho, apareceram completamente desestruturados e, raramente, as células apresentavam características de vitalidade. As células epiteliais foram, aparentemente, mais resistentes que as de natureza conjuntiva. O uso do meio de cultura, onde os discos ficaram depositados, foi menos prejudicial ao desenvolvimento dos germes dentais que os outros dois procedimentos (Figura 3).

CRCS

Os germes dentais, cultivados durante 6 dias em meio contendo CRCS, mostraram, nas três condições de experimentação, uma alteração no desenvolvimento não compatível com a fase correspondente. Os melhores resultados encontrados foram os que empregaram o meio de cultura onde os discos ficaram depositados na estufa de CO₂ durante 15 dias. Nesta última condição, as células epiteliais foram as que melhor preservaram suas características, porém, o germe dental não evoluiu tanto em forma quanto em diferenciação celular (Figura 4).

Óxido de zinco e eugenol

Os germes dentais cultivados em meio de cultura contendo óxido de zinco e eugenol mostraram, nas três condições de experimentação, um desenvolvimento não compatível com o período de observação. Enquanto com a utilização dos discos – quer logo após o seu preparo quer após o período de incubação na estufa – verificou-se destruição total das estruturas do germe dental, com o emprego do meio de cultura onde os discos ficaram depositados houve preservação das estruturas, sem, entretanto, ocorrer evolução do germe dental e diferenciação celular (Figura 5).

Germes dentais com 17 dias

Controle

Os germes dentais, obtidos de fetos com 17 dias e cultivados por 6 dias em meio de cultura controle, apresentavam-se em fase de campânula avançada, com a morfologia característica de molares. O órgão do esmalte mostrava suas estruturas componentes características, com uma camada de ameloblastos constituída por células altas, diferenciadas nas partes superficiais às cúspides e menores e menos

diferenciadas em direção cervical. Os demais componentes do órgão do esmalte, quando presentes, mostravam-se tipicamente constituídos.

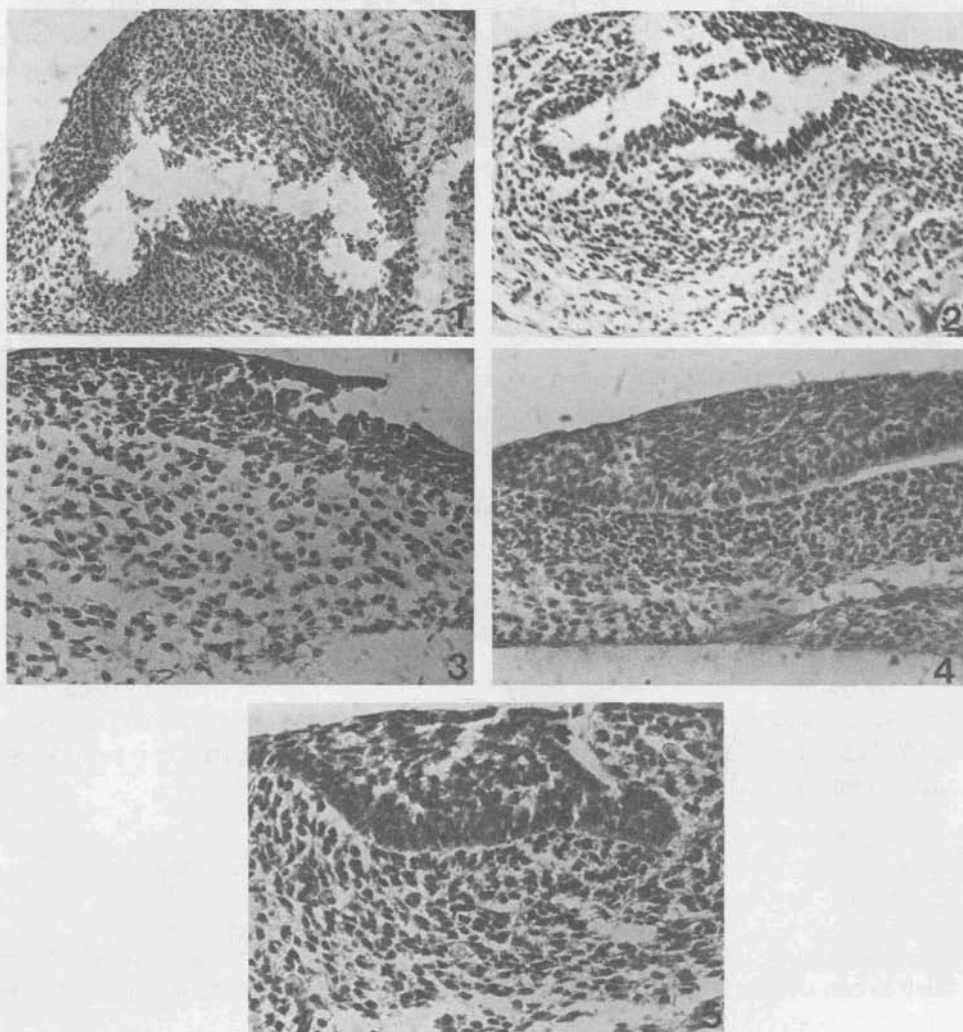


FIGURA 1 - Germe dental de feto, com 14 dias, cultivado em meio de cultura controle durante 6 dias. HE. 250x.

FIGURA 2 - Germe dental de feto, com 14 dias, cultivado por 6 dias no meio de cultura onde ficaram depositados os discos de Sealapex durante 15 dias na estufa. HE. 250x.

FIGURA 3 - Germe dental de feto, com 14 dias, cultivado por 6 dias no meio de cultura onde ficaram depositados os discos de AH-26 durante 15 dias na estufa. HE. 375x.

FIGURA 4 - Germe dental de feto, com 14 dias, cultivado por 6 dias no meio de cultura onde ficaram depositados os discos de CRCS durante 15 dias na estufa. HE. 72x.

FIGURA 5 - Germe dental de feto, com 14 dias, cultivado por 6 dias no meio de cultura onde ficaram depositados os discos de óxido de zinco e eugenol durante 15 dias na estufa. HE. 450x.

A camada superficial da papila dental estava constituída por células não muito altas, com núcleo basal. Recobrimo-as, isto é, entre os ameloblastos e os odontoblastos, identificava-se uma camada de pré-dentina que se estendia da região das cúspides para a região cervical, adelgaçando-se nesse sentido. Os demais componentes celulares da papila apresentavam-se uniformemente distribuídos, com uma concentração ligeiramente menor na sua parte central (Figura 6).

Tratados

Sealapex

Os germes dentais cultivados durante 6 dias em meio contendo Sealapex, nas três condições de experimentação, mostraram-se completamente sem características de vitalidade. Embora em alguns casos percebam-se remanescentes dos tecidos de origem epitelial, seus aspectos foram piores que os encontrados com os germes de 14 dias (Figura 7).

AH-26

Os germes dentais cultivados durante 6 dias em meio contendo AH-26 mostravam-se completamente destruídos e com suas células sem vitalidade, nas três condições experimentais, muito pouco podendo ser identificado como tecidos destinados à formação do órgão dental (Figura 8).

CRCS

Os germes dentais cultivados durante 4, 5 ou 6 dias em meio contendo CRCS, nas três condições de experimentação, não apresentavam características compatíveis com a idade analisada, acrescida do período de cultivo. Os tecidos epiteliais foram os que mostraram mais resistência aos efeitos do material.

Os resultados menos drásticos foram encontrados quando da utilização do meio de cultura em que os discos de material odontológico ficaram depositados na incubadora de CO₂ (Figura 9).

Óxido de zinco e eugenol – Os germes dentais cultivados durante 6 dias em meio de cultura contendo óxido de zinco e eugenol, nas três condições de experimentação, mostraram evidências grandes de incompatibilidade. Puderam-se visualizar, com o uso dos discos imediatamente após a sua preparação, ou com o uso do meio de cultura onde os discos ficaram incubados na estufa de CO₂, melhores resultados que os identificados quando se utilizam os discos após a sua incubação (Figura 10).

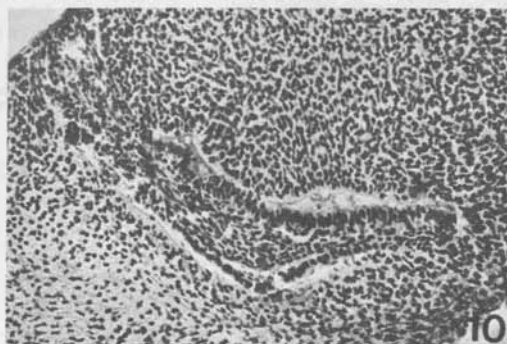
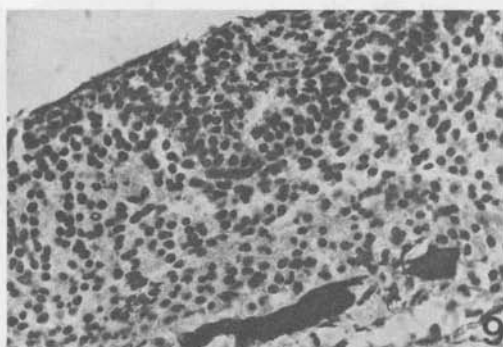
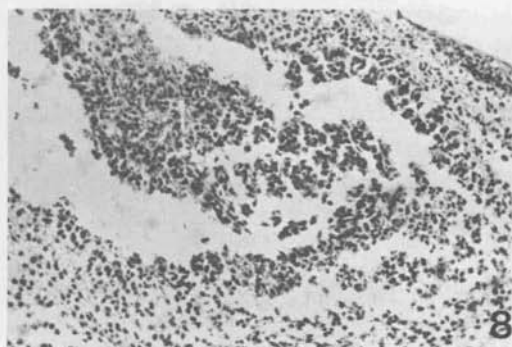
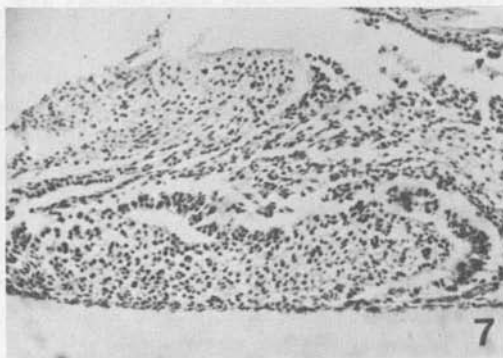
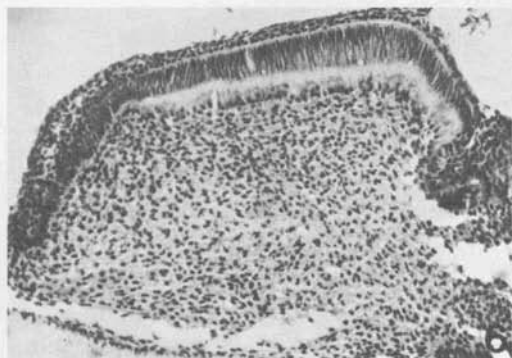


FIGURA 6 - Germe dental de feto, com 17 dias, cultivado em meio de cultura controle durante 6 dias. HE. 225x.

FIGURA 7 - Germe dental de feto, com 17 dias, cultivado durante 6 dias em meio de cultura contendo discos recém-preparados de Sealapex. HE. 200x.

FIGURA 8 - Germe dental de feto, com 17 dias, cultivado por 6 dias no meio de cultura onde ficaram depositados os discos de AH-26 durante 15 dias na estufa. HE. 225x.

FIGURA 9 - Germe dental de feto, com 17 dias, cultivado por 6 dias em meio de cultura contendo discos recém-preparados de CRCS. HE. 400x.

FIGURA 10 - Germe dental de feto, com 17 dias, cultivado por 6 dias em meio de cultura contendo discos recém-preparados de óxido de zinco e eugenol. HE. 188x.

Discussão

Os germes dentais cultivados em meio controle desenvolveram-se satisfatoriamente como originalmente descrito.^{1,5,6,10,15}

Substâncias alcalinas como o Sealapex, à semelhança do que ocorre com o Dycal, ambos à base de hidróxido de cálcio, comportam-se como tóxicas *in vitro* devido ao seu alto pH.^{3,12} Por outro lado, a verificação de que o Ca(OH)_2 era inerte² foi atribuída, presumivelmente, ao pequeno volume da amostra quando comparado ao utilizado no sistema *in vitro*. Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que, na presença do Sealapex, os germes dentais com 14 ou com 17 dias estavam completamente desestruturados e sem vitalidade; as observações permitiram verificar que os germes com 14 dias apresentaram um comportamento menos sensível que os verificados com aqueles com 17 dias e, ainda, que a incubação com o meio onde os discos ficaram depositados foi menos prejudicial. Tais observações confirmam a maior resistência dos germes de 14 dias em relação aos de 17 dias ao sistema empregado, entretanto, tais resultados divergiram dos achados de um dos autores que mostraram que os discos incubados apresentaram resultados melhores que os encontrados quando utilizados os outros dois sistemas de trabalho.⁶

Com o emprego do AH-26, pôde-se verificar que houve um efeito altamente tóxico do material aos germes dentais, impedindo seu desenvolvimento, nas três condições de experimentação; os melhores resultados, embora ruins, foram alcançados com os germes de fetos de 14 dias e com o emprego do meio de cultura onde os discos ficaram depositados. Tais resultados, mais uma vez, discordam dos que relataram melhores resultados com a utilização dos discos que ficaram incubados por 15 dias em meio de cultura.⁶

Os resultados alcançados com o emprego do CRCS, um selador de canal radicular que contém na sua formulação hidróxido de cálcio, foram muito semelhantes aos obtidos com o emprego do Sealapex. Assim, o cultivo no meio onde os discos ficaram depositados permitiam verificar, em quase todos os casos, o contorno de tecido epitelial original, e que estavam melhor preservadas as estruturas no germe obtido de fetos com 14 dias. Tais observações, mais uma vez, por um lado, corroboram as obtidas anteriormente com relação à idade fetal e, por outro lado, delas divergem quanto ao tipo de sistema de trabalho que levou a melhores resultados.⁶

O emprego do óxido de zinco e eugenol, à semelhança do IRM, um composto similar reforçado, levou a resultados comparáveis aos obtidos com os outros materiais testados. O meio de cultura onde os discos ficaram incubados foi o método que levou aos melhores resultados, particularmente com os germes de 14 dias. Nas demais circunstâncias, não houve evolução dos germes cultivados e a maioria das células mostrava-se sem vitalidade. Tais achados, mais uma vez, corroboram os relatos que os germes aos 14 dias são mais compatíveis com os métodos de teste aqui utilizados, porém, não concordam com a observação de que o meio onde os discos ficaram depositados levassem, da mesma forma, aos melhores resultados;⁶ concordam tam-

bém que o óxido de zinco e eugenol recentemente preparado inibe o crescimento das células, devido à volatilidade do eugenol, propriedade que, por outro lado, possibilitou o crescimento celular quando usado 3 dias após sua preparação² e corrobora a observação de que o eugenol é liberado para o meio em quantidades que diminuem com o tempo.⁸

Os resultados alcançados neste trabalho mostraram que os materiais odontológicos seladores de canais radiculares são tóxicos, corroborando as observações sobre citotoxicidade de seladores endodônticos¹¹ e que é importante tanto a maneira de se preparar o material quanto a maneira pela qual ele é colocado na presença dos tecidos, as quais podem alterar os efeitos observados.^{9,13} Mostraram também que o sistema é sensível às substâncias desprendidas pelos materiais odontológicos seladores de canais radiculares analisados. Tal observação vem confirmar a informação quanto à sensibilidade do sistema às conhecidas toxinas dos materiais odontológicos,⁶ e que os testes *in vitro* são muito mais sensíveis aos efeitos nocivos dos materiais sobre o metabolismo celular do que o são as células e tecidos *in situ*,⁴ mesmo que acrescidas de outras substâncias na sua formulação.⁷

As observações realizadas a partir dos germes dentais das duas idades estudadas confirmam que os germes obtidos de animais com 14 dias são mais resistentes às condições de experimentação, talvez porque suas células, em fase de multiplicação, sejam capazes de compensar melhor as injúrias sofridas do que as células pós-mitóticas, diferenciadas, obtidas nos germes dos fetos com 17 dias.⁶

Conclusão

Todos os materiais odontológicos seladores de canais radiculares, avaliados neste trabalho, mostraram-se incompatíveis com os germes dentais quando utilizados *in vitro*. Foi possível verificar que os germes dentais obtidos dos animais mais jovens são mais resistentes que os obtidos de animais mais velhos. A utilização do meio de cultura onde os discos ficaram depositados proporcionou resultados melhores que os experimentos que empregaram os discos propriamente ditos, quer logo após a sua preparação quer após o período de incubação, sugerindo que a liberação de substâncias tóxicas para o meio é constante na presença do disco, mas que as mesmas se dissipam na sua ausência.

HETEM, S., KANNO, C. M., MATHEUS, M. T. G. Compatibility testing of root canal filling materials in tooth germs *in vitro*. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 22, n. 2, p. 175-185, 1993.

- **ABSTRACT:** Lower first molar tooth germs of 14 or 17 days mouse fetuses were cultured *in vitro* either with Sealapex, CRCS, AH-26 or zinc oxide and eugenol, for 6 days. The dental materials were exposed to the culture system as either fresh material, leached discs (by pre-incubation in media) or the medium from the incubated discs at 37°C. All the analysed dental materials appeared as incompatibles with the tooth germ development at these experimental conditions. The younger tooth germs showed best results than those obtained with the older ones. The medium from the incubated discs have presented better results when compared to the two others experimental conditions. The results suggest that there is a liberation of toxic substances to the medium in the presence of the dental materials, but that they are dissipated in its absence.
- **KEYWORDS:** Biocompatible materials; root canal filling materials; tooth germ.

Referências bibliográficas

1. COHN, S. A. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am. J. Anat.*, v. 101, p. 295-319, 1957.
2. DAS, S. Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 52, p. 76-84, 1981.
3. GORDON, T. M., ALEXANDER, J. B. Influence on pH level of two calcium hydroxide root canal sealers *in vitro*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 61, p. 624-8, 1986.
4. HANKS, C. T., BERGENHOLTZ, G., KIN, J. S. Protein synthesis *in vitro*, in the presence of Ca(OH)₂ - containing pulp-capping medicaments. *J. Oral Pathol.*, v. 12, p. 356-65, 1983.
5. HAY, M. F. The development *in vivo* and *in vitro* of the lower incisors and molars of the mouse. *Arch. Oral Biol.*, v. 3, p. 86-109, 1961.
6. HETEM, S., JOWETT, A. K., FERGUSON, M. W. J. Biocompatibility testing of a posterior composite and dental cements using a new organ culture model. *J. Dent.*, v. 17, p. 155-61, 1989.
7. HOLLAND, R. et al. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães após a obturação de canal com sealapex acrescido ou não de iodofórmio. *Rev. Odontol. UNESP*, v. 19, p. 97-101, 1990.
8. HUME, W. R. An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. *J. Dent. Res.*, v. 63, p. 881-4, 1984.
9. JOWETT, A. K., FERGUSON, M. W. J., COMBE, E. C. *In vitro* biocompatibility testing: a new organ culture method. *J. Dent.*, v. 16, p. 55-65, 1988.
10. KARAKUSEVIC, S. A new biocompatibility model system: murine tooth germs organ culture on collagen. *J. Dent. Res.*, v. 67, p. 551, 1988.
11. PASCONE, E. A., SPANGBERG, L. S., LANGELAND, K. Cytotoxicity of endodontic sealers. *J. Dent. Res.*, v. 66, p. 200, 1987.
12. SCHRODER, V. Effects of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J. Dent. Res.*, v. 64, p. 541-8, 1985.

13. SPANGBERG, L., PASCON, E. The importance of material preparation for evaluation of cytotoxicity. *J. Dent. Res.*, v. 66, p. 200, 1987.
14. WENNBERG, A., MJOR, I. A., HENSTEN-PETTERSEN, A. Biological evaluation of dental restorative materials – a comparison of different test methods. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 17, p. 23-36. 1983.
15. YAMADA, K. M., BRINGAS, P., GRODIN, M. Chemically defined organ culture of embryonic mouse tooth germs morphogenesis, dentinogenesis and amelogenesis. *J. Biol. Buccale*, v. 8, p. 127-39, 1980.

Recebido em 25.2.1993.