

## Avaliação in vitro de sistemas adesivos de dentina aplicados sobre células odontoblastóides

Carlos Alberto de Souza COSTA<sup>a</sup>, Josimeri HEBLING<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UNESP 14801-903 Araraquara - SP

<sup>b</sup>Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP 14801-903 Araraquara - SP

Costa CAS, Hebling J. In vitro evaluation of adhesive systems applied on culture of odontoblast-like cells. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(1): 97-106.

**Resumo: Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade de dois agentes adesivos dentinários. **Material e método:** Células imortalizadas de linhagem odontoblástica (MDPC-23) foram semeadas (30.000 células/cm<sup>2</sup>) sobre lamínulas de vidro posicionadas na base de 4 recipientes com 24 compartimentos. Após 24 horas de incubação, o número de células aderidas ao substrato foi contado. Sobre essas células, foram colocados 995 µL de meio de cultura, no qual era adicionado 5 µL de cada material experimental: Grupo 1- Clearfil Liner Bond 2V (Kuraray Co.); Grupo 2- Single Bond (3M ESPE); e Grupo 3- Hidróxido de cálcio (Pathfinder Associates Inc.). No Grupo 4 (controle), 5 µL de tampão fosfato foi adicionado ao meio de cultura, e o número de células foi novamente contado. O metabolismo celular foi avaliado pela técnica do methyltetrazolium, sendo a morfologia das células caracterizada em MEV. Os dados numéricos obtidos foram submetidos à análise estatística de ANOVA complementada pelos testes de Tukey, *t*-student, e Dunnett. **Resultados:** Para os grupos 1, 2 e 3, o número de células reduziu em 65, 73 e 14%, respectivamente. Os testes estatísticos determinaram a significante diferença entre todos os grupos comparados entre si ou ao grupo controle. A redução no metabolismo celular para os grupos 1, 2 e 3 foi de 99, 99 e 37%, respectivamente. **Conclusão:** Ambos os agentes adesivos experimentais causaram intenso efeito citotóxico sobre as células odontoblastóides, sendo o hidróxido de cálcio considerado o material menos citopático para as células MDPC-23.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade; sistemas adesivos; cultura de células; odontoblastos.

**Abstract: Objective:** To evaluate the cytotoxicity of two current dentin bonding agents. **Material and methods:** The immortalized odontoblast cell line (MDPC-23) was plated (30,000 cell/cm<sup>2</sup>) on round glass discs placed in the bottom of 24 well dishes. After 72 hours incubation the cell number was counted. The following dental materials (5 µL) were added to the culture medium (995 µL) and applied for 120 minutes to the cultured cells in 24 wells for each group: Group 1- Clearfil Liner Bond 2V (Kuraray Co.); Group 2- Single Bond (3M ESPE); and Group 3- Calcium hydroxide (Pathfinder Associates Inc.). In group 4 (control), phosphate buffer saline solution was added to the fresh medium. The cell number was counted again. The cytotoxic effects were evaluated by using the MTT assay and the cell morphology was analysed by SEM. The scores obtained from the cell count and MTT assays were statistically analyzed by the ANOVA method complemented by Tukey, *t*-student, and Dunnett tests. **Results:** In groups 1, 2 and 3 the experimental materials decreased the cell number by 65, 73, and 14%, respectively. The difference among the experimental and control groups was statistically significant. In groups 1, 2, and 3, the materials reduced the cell metabolism by 99, 99, and 37%, respectively. **Conclusion:** Both experimental adhesive systems caused very high cytopathic effects to the MDPC-23 cells. On the other hand, the calcium hydroxide was the least cytotoxic material evaluated.

**Keywords:** Cytotoxicity; adhesive systems; culture of cells; odontoblasts.

## Introdução

A citotoxicidade dos materiais odontológicos, especialmente os resinosos, tem sido avaliada por meio de numerosas pesquisas *in vitro*<sup>1-4</sup>. Nessas pesquisas, os materiais experimentais, seus diferentes componentes isolados ou em combinação, ou ainda alíquotas desses componentes solubilizados em diferentes soluções foram colocados sobre células cultivadas em laboratório<sup>1-8</sup>. A maioria dessas pesquisas relatou que os componentes solúveis liberados pelos materiais resinosos experimentais, particularmente os diluentes de baixo peso molecular, são os principais responsáveis pela citotoxicidade *in vitro*.

Muitas investigações avaliaram isoladamente os efeitos tóxicos de alguns dos componentes monoméricos mais comumente usados nas resinas compostas, nos cimentos resinosos e nos agentes adesivos, tais como 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), bisglicidil metacrilato (BIS-GMA), trietilenoglicol dimetacrilato (TEG-DMA), uretano dimetacrilato (UDMA), e glicidil metacrilato (GMA)<sup>1,2,4</sup>. Nessas pesquisas, foi demonstrado o definido efeito citotóxico de diferentes concentrações desses monômeros, determinado pela avaliação da respiração mitocondrial, da síntese de proteínas, do conteúdo total de proteínas e da síntese de DNA.

Outras pesquisas *in vitro* têm avaliado a atividade genotóxica de componentes dos materiais dentários<sup>9</sup> ou ainda seu efeito imunossupressor sobre células acessórias derivadas da pulpa<sup>10</sup> e a alteração na secreção de TNF- $\alpha$  por monócitos cultivados<sup>11</sup>. Ratanasathien et al.<sup>3</sup> relataram a citotoxicidade interativa de combinações binárias de monômeros presentes em agentes adesivos de dentina. Esses pesquisadores propuseram uma classificação do potencial citotóxico dos principais componentes monoméricos dos materiais resinosos de acordo com sua concentração. Também foi discutida a possibilidade de a associação de diferentes componentes num mesmo material vir a fazer com que reduzida quantidade de monômeros residuais solúveis permaneça no material, resultando em menor efeito citotóxico. Como o desenvolvimento de novos agentes adesivos com diferentes composições é uma situação frequentemente observada na odontologia moderna, o objetivo do presente trabalho de pesquisa foi avaliar o possível efeito citotóxico de dois sistemas adesivos com diferentes composições quando aplicados sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

## Material e método

Noventa e seis lamínulas circulares de vidro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) com 12 mm de diâmetro foram posicionadas em quatro pratos retangulares de acrílico com 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Antes de serem utilizadas na presente pesquisa, as lamínulas de vidro foram mantidas em álcool a 70% pelo pe-

ríodo de 6 horas, sendo posteriormente lavadas, sob agitação constante, por 15 minutos com tampão fosfato em três trocas consecutivas da solução. Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram cultivadas em número de 30.000 células/cm<sup>2</sup> sobre as lamínulas de vidro posicionadas no fundo de cada um dos compartimentos. O meio de cultura utilizado nesta pesquisa foi o  $\alpha$ -MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina e glutamina. Os pratos de acrílico com as células cultivadas foram mantidos a 37°C em incubadora humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

Setenta e duas horas após o início do cultivo celular, o número de células MDPC-23 foi contado usando-se para isso um retículo óptico adaptado ao microscópio de luz NIKON (Nikon Eclipse TS 100, Tokyo, Japan). Após contagem inicial das células, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado, sendo substituído por uma solução composta pela mistura de 995  $\mu$ L de meio de cultura completo e 5  $\mu$ L dos materiais resinosos experimentais, ou por 995  $\mu$ L de meio de cultura completo e 5  $\mu$ L de água de hidróxido de cálcio. A água de hidróxido de cálcio adicionada ao meio de cultura completo foi preparada pela mistura de 5 g de pó de hidróxido de cálcio em 10 mL de água destilada esterilizada. Essa solução foi mantida no refrigerador a 4°C por 24 horas até que o pó de hidróxido de cálcio estivesse decantado no fundo do recipiente. Para o grupo controle, 5  $\mu$ L de tampão fosfato foi adicionado a 995  $\mu$ L de meio de cultura completo. Essas soluções compostas pela mistura de meio de cultura e materiais experimentais ou controle permaneceram sobre as células cultivadas pelo período de 120 minutos em incubadora. Então, o meio de cultura associado aos materiais experimentais e controle foram aspirados, sendo, em cada compartimento, novamente colocado 1 mL meio de cultura completo, no qual as células permaneceram por um tempo adicional de 4 horas. Finalmente, o número celular foi novamente contado, como descrito anteriormente. Vinte e quatro espécimes foram usados para cada material em teste: Grupo 1- Clearfil Liner Bond 2V (CLB2-V, Kuraray Co., Osaka, Japan – Sub-grupos CLB2-V.1 e CLB2-V.2); Grupo 2- Single Bond (SB, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA – Sub-grupos SB.1 e SB.2); Grupo 3- Hidróxido de cálcio (CaOH, Pathfinder Associates Inc., N. Muskegon, MI, USA – Sub-grupos CaOH.1 e CaOH.2). Para o Grupo 4 (controle), tampão fosfato (Sub-grupos TF.1 e TF.2) foi utilizado. Todos os Sub-grupos 1 (CLB2-V.1, SB.1, CaOH.1 e TF.1) representaram o número de células presentes sobre as lamínulas de vidro antes da aplicação dos agentes adesivos, água de hidróxido de cálcio ou tampão fosfato nos compartimentos dos pratos de acrílico. Por outro lado, todos os Sub-grupos 2 (CLB2-V.2, SB.2, CaOH.2 e TF.2) representaram o número de células sobre as lamínulas após 120 minutos de contato com os materiais experimentais, água de hidróxido de cálcio e tampão fosfato.

Após a contagem final do número de células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro, o metabolismo celular foi avaliado, através da análise da atividade mitocondrial dessas células, pela técnica do methyltetrazolium (MTT assay). Esse método de avaliação da atividade metabólica celular foi realizado porque estudos prévios demonstraram que essa técnica é a mais freqüentemente utilizada para essa finalidade, sendo caracterizada como efetiva para estimar a citotoxicidade dos materiais empregados em odontologia<sup>1,2,3,6</sup>. Os valores numéricos obtidos pela contagem celular e pela técnica de MTT foram submetidos à análise estatística de ANOVA associada a testes para comparações múltiplas de Tukey e Dunnett, quando os grupos foram comparados com a finalidade de determinar o efeito dos materiais experimentais sobre as células. Testes t-student foram aplicados às médias observadas para cada grupo nas condições experimentais antes e depois da mistura dos materiais ao meio de cultura e sua aplicação sobre as células. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de segurança de 95%.

Ainda dentro da análise dos efeitos dos materiais experimentais sobre as células MDPC-23, estas tiveram sua morfologia avaliada por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) após fixação dos espécimes por 24 horas, em 2,5% de glutaraldeído (Electron Microcopy Science, Fort Washington, PA, USA), em tampão fosfato (PBS), pós-fixação por 1 hora em tetróxido de ósmio (Electron Microcopy Science, Fort Washington, PA, USA) e processamento para ponto crítico. Para isso, duas lamínulas de vidro dos compartimentos representativos de cada um dos grupos experimentais e controle foram removidas e processadas para avaliação das células em MEV.

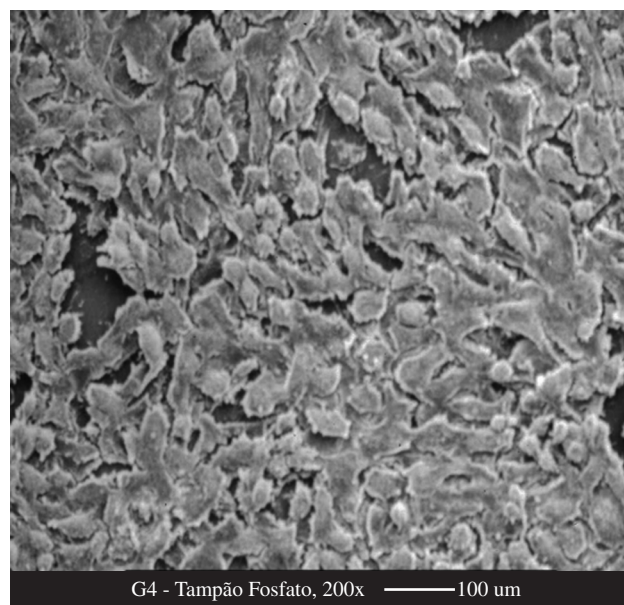
## Resultado

Os valores referentes à contagem do número de células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro antes e após aplicação dos materiais experimentais e controle estão demonstrados no Tabela 1. Também, foi determinado que a mistura de 995 µL de meio de cultura e 5 µL dos materiais experimental ou controle ocasionou a variação no pH final da solução (Tabela 1). O resultado da mistura dos materiais

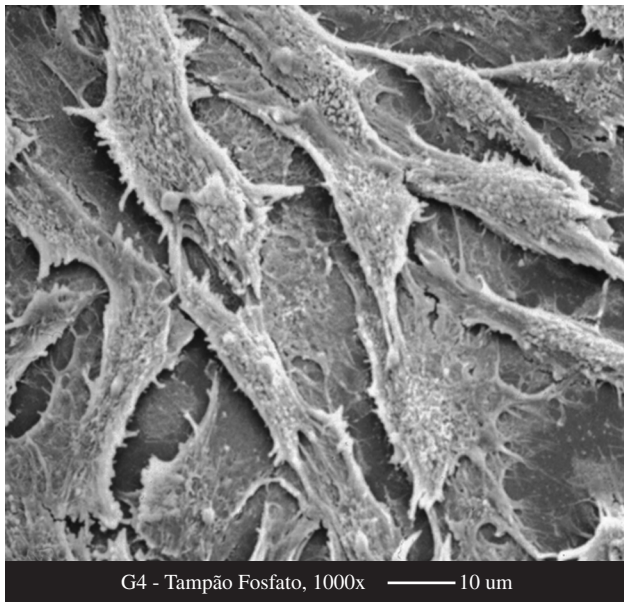
em teste e meio de cultura e de sua aplicação por 120 minutos sobre as células MDPC-23 também causou notável variação no número dessas células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Quando comparada com o grupo controle (TF), a redução do número de células, em nível de porcentagem, para os Grupos 1, 2 e 3 foi de 65, 73, 14%, respectivamente. A aplicação da técnica do methyltetrazolium (MTT assay) demonstrou ocorrer importante diferença entre os grupos experimentais resinosos (G1 e G2), grupo do hidróxido de cálcio (G3) e grupo controle tampão fosfato (G4). Como este grupo 4 (controle) representou a taxa percentual de 100% com relação à respiração mitocondrial das células, foi determinado que, para os Grupos 1 e 2, ocorreu uma redução de 99% no metabolismo celular, enquanto, para o Grupo 3, essa redução foi da ordem de 37%. Dois espécimes representativos de cada grupo experimental e controle foram selecionados para avaliação da morfologia das células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro. Assim, foi possível demonstrar, para o grupo controle (G4), que as células MDPC-23 apresentavam-se organizadas em nódulos epitelióides, que estavam próximos da confluência (Figuras 1 e 2). Essas células, de maneira individual, exibiam forma alongada com finos e longos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Esses prolongamentos citoplasmáticos pareciam aderir as células MDPC-23 ao substrato de vidro. Semelhante organização celular foi observada para o grupo do hidróxido de cálcio (G3). Todavia, nesse Grupo 3, foi

**Tabela 1.** Número de células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro antes e após aplicação dos materiais experimentais e controle

Grupos	Materiais	Número de células			
		antes	pH da solução	depois	pH da solução
G1	CLB2-V	454	(7,4)	155	(6,9)
G2	SB	455	(7,4)	122	(7,1)
G3	CaOH	448	(7,4)	381	(8,1)
G4	TF	436	(7,4)	445	(7,4)



**Figura 1.** Grupo 4 (controle), Tampão Fosfato. Observar as células organizadas em nódulos epitelióides, que estão próximos da confluência. MEV, 200x.

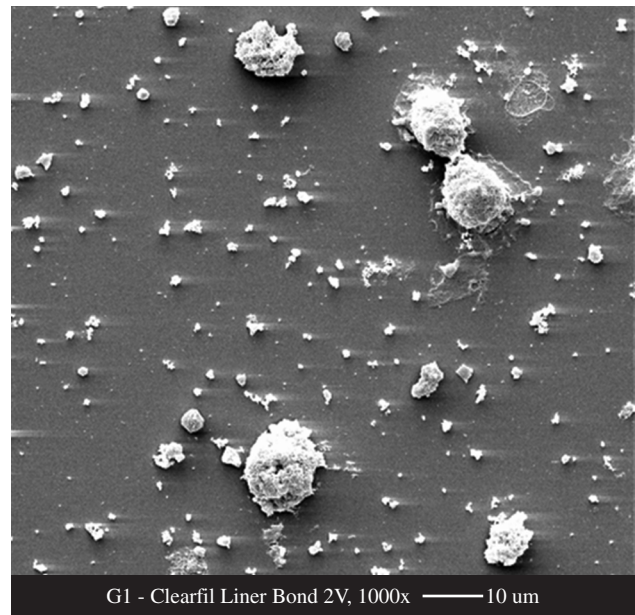


**Figura 2.** Grupo 4 (controle), Tampão Fosfato. As células exibem forma alongada com finos e longos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana. Esses prolongamentos citoplasmáticos pareciam aderir essas células MDPC-23 ao substrato de vidro. MEV, 1000x.

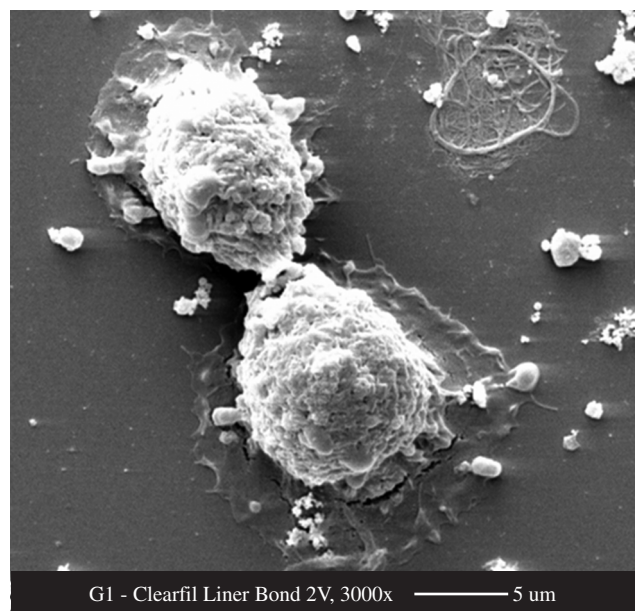
observada redução do número de células que compunham os nódulos epitelióides aderidos ao substrato de vidro. Para os grupos dos agentes adesivos (G1 e G2), as poucas células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibiam forma arredondada, com perda total ou manutenção de poucos prolongamentos citoplasmáticos curtos originados de sua membrana (Figuras 3 a 10). Em algumas situações, as células MDPC-23, em contato com o CLB2-V, exibiam apenas alguns finos prolongamentos citoplasmáticos aderindo seu corpo celular ao substrato de vidro (Figuras 5 e 6). Todavia, a maioria das células exibia tamanho reduzido com forma arredondada e com ausência de prolongamentos citoplasmáticos, características estas especialmente comuns para o Grupo SB (Figuras 7, 8 e 9). Também foi observada em muitas células, principalmente aquelas em contato com SB, a ocorrência de rompimento da membrana celular (Figura 10).

### Análise estatística (número de células)

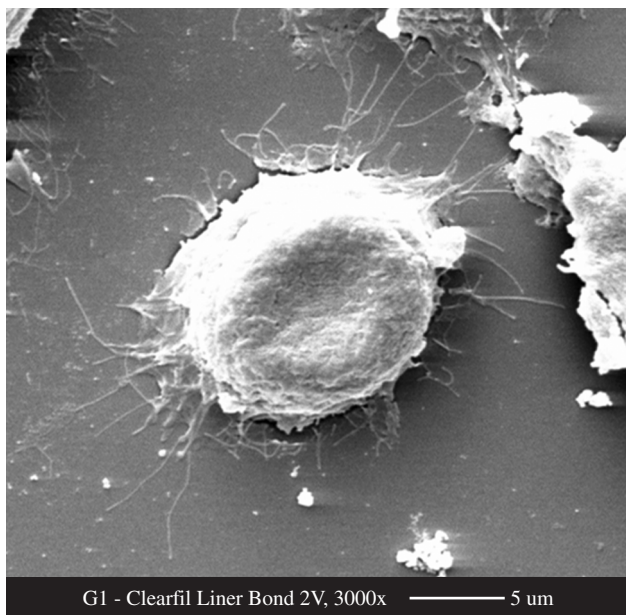
Testes t-student foram aplicados para comparar o número de células odontoblastóides que permaneceram aderidas ao substrato de vidro antes e após a adição de cada agente adesivo experimental e hidróxido de cálcio no meio de cultura. Os resultados estão apresentados graficamente na Figura 11. Uma vez que os resultados dos testes de normalidade e homogeneidade de variância demonstraram que



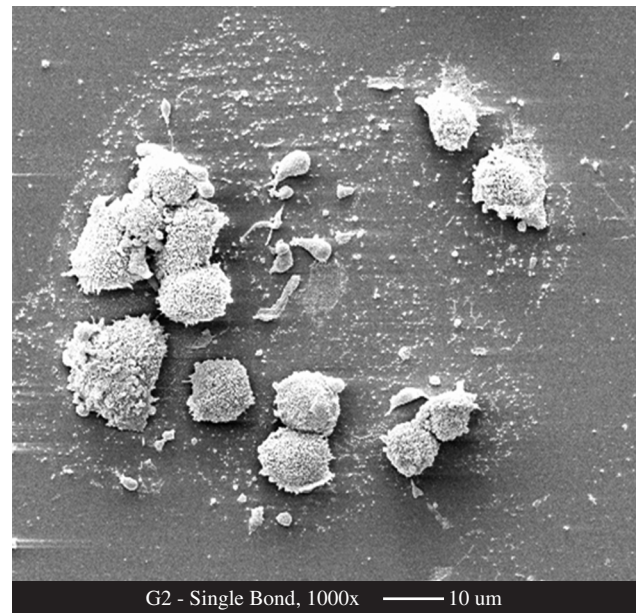
**Figura 3.** Grupo 1, Clearfil Liner Bond 2V. As poucas células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro exibiam morfologia arredondada e de tamanho reduzido (comparar o tamanho dessas células com o daquelas demonstradas na Figura 2). Restos de células mortas ou que se desprenderam do substrato de vidro podem ser observados ao redor daquelas que estavam aderidas. MEV, 1000x.



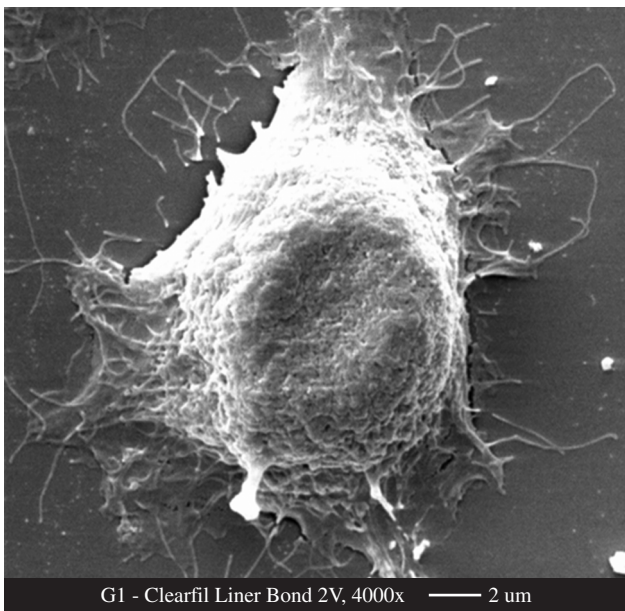
**Figura 4.** Grupo 1, Clearfil Liner Bond 2V. Detalhe da figura anterior. Notar a forma arredondada das células e a perda da maioria dos prolongamentos citoplasmáticos. MEV, x 3000x.



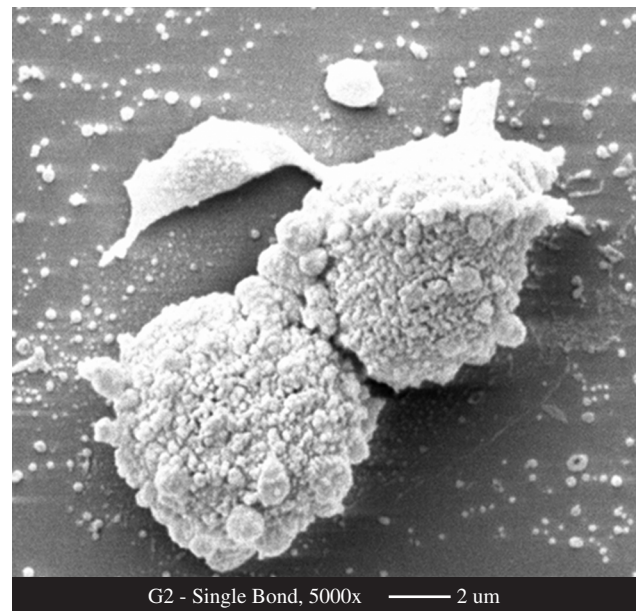
**Figura 5.** Grupo 1, Clearfil Liner Bond 2V. 5 – Célula MDPC-23 com morfologia arredondada, porém com tamanho superior àquele observado na figura anterior. Notar que, neste caso, a célula exibe poucos prolongamentos citoplasmáticos finos que parecem mantê-la aderida ao substrato de vidro. MEV, 3000x.



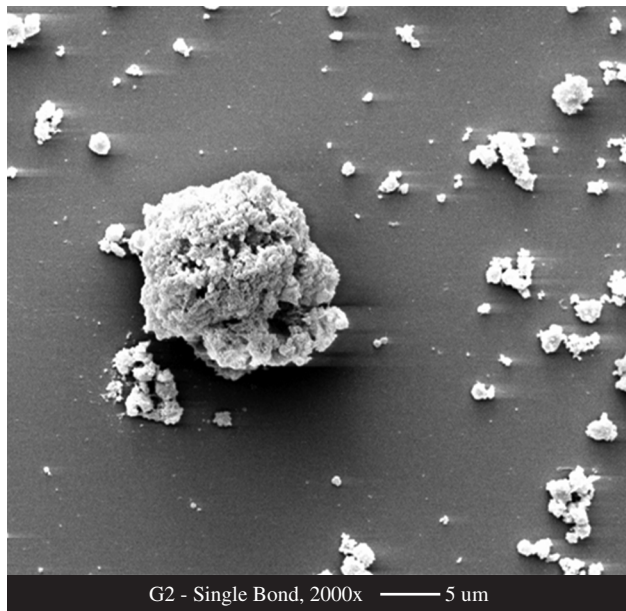
**Figura 7.** Grupo 2, Single Bond. Observar uma área que caracterizava um nódulo epiteióide, porém com apenas algumas células odontoblastóides que permaneceram aderidas ao substrato de vidro após adição do agente adesivo ao meio de cultura. MEV, 1000x.



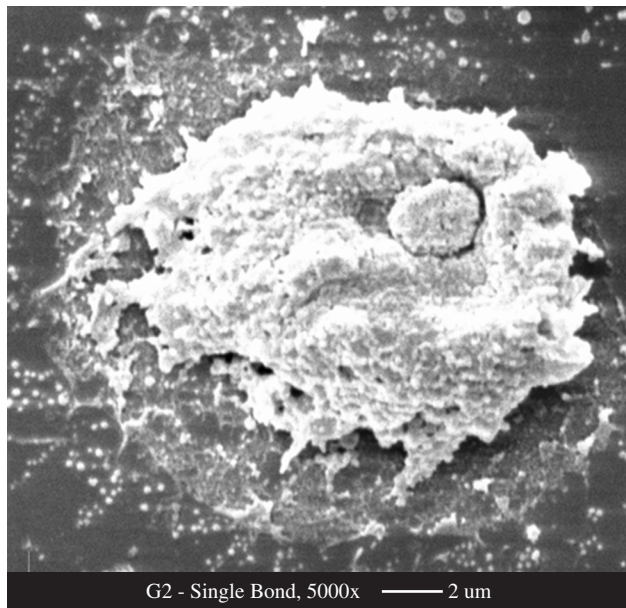
**Figura 6.** Grupo 1, Clearfil Liner Bond 2V. Detalhe de uma célula odontoblastóide com morfologia alterada, porém ligeiramente alongada e com prolongamentos citoplasmáticos, que parecem partir de sua membrana para aderí-la ao disco de vidro. MEV, 4.000x.



**Figuras 8.** Grupo 2, Single Bond. Detalhe da figura anterior, onde duas células MDPC-23 assumiram morfologia arredondada, semelhante aquela observada para o grupo CLB2-V (Figura 3). Notar que, apesar de as células terem perdido praticamente todos os seus prolongamentos citoplasmáticos, a membrana citoplasmática se manteve intacta (sem ruptura). MEV, 5.000x.

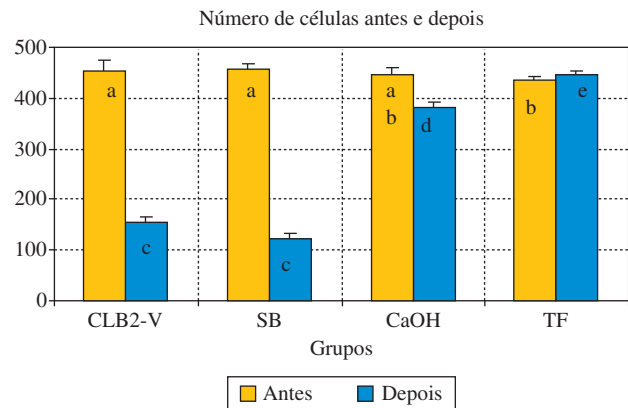


**Figuras 9.** Grupo 2, Single Bond. Células MDPC-23 isoladas com forma arredondada e em início de ruptura da membrana citoplasmática. MEV, 2000x.



**Figuras 10.** Grupo 2, Single Bond. Apesar de a célula manter sua morfologia ligeiramente alongada (Figura 6), observar a grave ruptura da membrana celular com eliminação de fragmentos para o meio, o que pode caracterizar uma morte celular rápida. MEV, 5000x.

os dados apresentavam distribuição normal ( $p > 0,05$ ) e as variâncias apresentavam homogeneidade ( $p > 0,05$ ), o teste estatístico de análise de variância a um critério fixo foi aplicado ao número de células antes da aplicação dos materiais



**Figura 11.** Gráfico de barras ilustrativo das médias de número de células para os grupos experimentais antes e após sua aplicação (barra de erro = 1SD). Letras iguais representam médias estatisticamente iguais.

com o objetivo de avaliar a igualdade das médias iniciais. Essa análise de variância demonstrou haver diferença entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Assim, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado para localizar estas diferenças, considerando os grupos dois a dois, sendo então evidenciado que o Grupo 4 (TF) apresentava média estatisticamente superior à dos Grupos 1 (CLB2-V) e 2 (SB), porém estatisticamente igual à do Grupo 3 (CaOH).

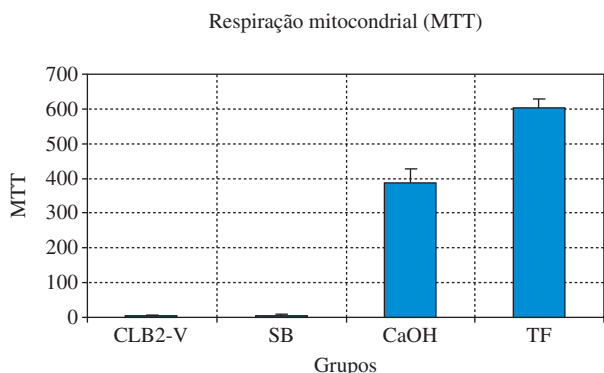
Finalmente, o teste de Tukey aplicado ao número de células finais determinou que todas as médias, comparando-se os grupos dois a dois, são estatisticamente diferentes. Assim sendo, o Grupo TF foi o menos agressivo, uma vez que o número final de células foi o maior, enquanto o Grupo SB foi o mais agressivo.

### Análise estatística (metabolismo celular)

A análise estatística de Levene aplicada aos dados numéricos de metabolismo celular determinou que, embora todos os grupos apresentassem distribuição normal, não havia homogeneidade de variância. O teste estatístico de ANOVA para o fator respiração mitocondrial mostrou haver diferença estatística entre as médias dos diferentes grupos. Portanto, e devido ao fato de não existir homogeneidade de variância, o teste estatístico de Dunnett para comparações múltiplas foi aplicado (Figura 12), sendo possível demonstrar que apenas os Grupos 1 (CLB2-V) e 2 (SB) apresentaram médias estatisticamente iguais.

### Discussão

Entre as variadas metodologias atualmente recomendadas para avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos materiais dentários nos diferentes níveis de pesquisa, os testes in vitro em cultura de células são os que fazem parte



**Figura 12.** Representação em gráfico de barras das médias referentes à respiração mitocondrial de acordo com os grupos.

dos protocolos iniciais que mais amplamente têm sido utilizados por muitos pesquisadores<sup>1-8</sup>. Para o desenvolvimento desses testes, cultura primária de células de variadas linhagens imortalizadas, tais como L929, Balb 3T3 e outras, além de células obtidas da polpa têm sido utilizadas. Todavia, intenso debate tem ocorrido sobre qual tipo de célula seria mais indicado para esses testes in vitro, se células diploides ou de linhagem contínua. Enquanto não há definições sobre esse tema, estudos recentes têm determinado que tipos celulares distintos respondem de maneira diferente quando expostos a materiais experimentais<sup>5</sup>. Como os odontoblastos são as células pulpares mais periféricas com relação à polpa, revestindo toda a extensão interna da dentina coronária e radicular, é sugerido que esse tipo específico de célula estaria mais susceptível a agressões externas de variada procedência, inclusive àquelas decorrentes de diferentes procedimentos clínicos ou então por contato direto de materiais dentários, que podem se difundir através dos túbulos dentinários para alcançar o espaço pulpar. Todavia, há algumas limitações para a utilização de células pulpares em pesquisas in vitro, tais como a dificuldade de isolar uma população homogênea de odontoblastos, a manutenção do fenotipo do odontoblasto por longo período de tempo e a definição da linhagem de odontoblastos pela determinação das proteínas expressas por esse tipo celular<sup>12</sup>. Ainda, têm sido apontadas como outras dificuldades, a falta de habilidade dos odontoblastos em proliferar em cultura primária e a difícil obtenção de cultura primária, que pode consumir muito tempo para ser estabelecida, além do que essas células pulpares podem, ainda, ser induzidas a se diferenciar em outro tipo celular durante a proliferação<sup>12,13</sup>. Todavia, com o objetivo de superar essas dificuldades e, assim, fornecer odontoblastos para testes de citotoxicidade in vitro, células mesenquimais de polpas de ratos foram induzidas a expressar o fenotipo de odontoblasto em especiais condições laboratoriais. Assim, algumas linhagens específicas de células imortalizadas, RPC-C2A<sup>14</sup>,

RDP4-1<sup>15</sup>, MO6-G3<sup>16</sup> e MDPC-23<sup>17</sup> foram estabelecidas nas últimas décadas. Recentemente, foi demonstrado que as células RPC-C2A e RDP4-1 não expressam proteínas específicas dos odontoblastos, sendo, por isso, caracterizadas como pré-odontoblastos. Assim, na presente pesquisa, células MDPC-23 foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos materiais experimentais através da contagem e da análise da morfologia celular, bem como da determinação do metabolismo celular. Essa linhagem de célula espontaneamente imortalizada e clonada foi selecionada devido ao fato de ter sido efetivamente caracterizada como de linhagem odontoblastica por apresentar morfologia epitelióide com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos, alta atividade de fosfatase alcalina e por expressar fosfoforina da dentina (DPP) e sialoproteína da dentina (DSP), proteínas estas expressas e sintetizadas apenas por verdadeiros odontoblastos<sup>18,19</sup>. Ainda, as células odontoblastóides MDPC-23 foram utilizadas em pesquisas anteriores, em que foi avaliada a citotoxicidade de outros agentes adesivos<sup>6</sup>, soluções irrigadoras e de lavagem de polpas expostas<sup>20</sup> e também para determinar, in vitro<sup>21</sup> o efeito do tempo de polimerização sobre a ação citopática de resinas compostas restauradoras.

Na presente pesquisa, o efeito citotóxico dos materiais experimentais avaliados foi claramente demonstrado pela metodologia de contagem do número de células e pela determinação do metabolismo celular (respiração mitocondrial). Intenso e significativo efeito citotóxico causado pelos sistemas adesivos Single Bond (SB - 3M ESPE), Prime & Bond 2.1 (PB - Dentsply) e Syntac Sprint (SS - Vivadent) sobre células de linhagem odontoblastica também foi demonstrado na literatura<sup>6</sup>. Os agentes adesivos SB, PB e SS reduziram o número de células em 41,0, 52,7 e 47%, respectivamente. Assim, pôde-se caracterizar que, enquanto em pesquisa anterior o adesivo dentinário SB reduziu em 41% o número de células aderidas ao substrato, na presente pesquisa, a taxa de redução para o mesmo material foi de 65%. É possível especular que a variação porcentual e numérica observada entre as duas pesquisas possa ser explicada pelo fato de ser diferente o número de passagens das células MDPC-23, o que pode fazer com que elas se tornem mais sensíveis aos materiais experimentais. Apesar dessa sugestão, pesquisas recentes revelaram que as células MDPC-23 mantêm seu fenotipo independente do número de passagens (3, 37 ou 77). Todavia, não foi determinada se sua sensibilidade também é mantida com o decorrer do tempo.

O efeito do pH dos meios de cultura onde foram adicionados os materiais experimentais pode ser fator decisivo para a citotoxicidade sobre as células. Este fator já foi anteriormente discutido na literatura<sup>20</sup>, tendo, na presente pesquisa, o valor do pH dos meios de cultura com adição dos materiais em avaliação sofrido discreta alteração. Nesta pesquisa, assim como já relatado na literatura<sup>20</sup>, o meio de cultura associado ao hidróxido de cálcio foi aquele que so-

freu maior variação de pH (pH 8,1) quando comparado com o pH do meio de cultura misturado com TF (grupo controle – pH 7,4). Talvez esse pH básico determinado para o grupo do hidróxido de cálcio pudesse causar algum dano celular ou mesmo estimular o processo de mineralização nos nódulos de células MDPC-23, que expressam fortemente fosfatase alcalina. Todavia, traços de mineralização não foram observados no Grupo 3 quando os espécimes foram submetidos à avaliação em microscopia eletrônica de varredura. Por outro lado, pôde-se especular que a diminuição no número de células que permaneceram aderidas ao substrato, bem como a redução no metabolismo celular demonstrado para o Grupo 3 tenham sido decorrência da discreta alcalinidade do meio de cultura. A alcalinidade de materiais baseados em hidróxido de cálcio tem sido amplamente demonstrada na literatura como sendo responsável por morte celular, seguida de necrose de coagulação quando este material, na forma de pó ou pasta, é aplicado diretamente sobre tecido conjuntivo<sup>22,23</sup>. Quanto aos Grupos 1 e 2, nos quais agentes adesivos CLB2-V e SB foram avaliados, pode-se sugerir que a própria ação dos componentes desses materiais resinosos, isoladamente ou em associação, foi a responsável pela notável morte de células e pela drástica redução no metabolismo celular.

O mecanismo de ação dos materiais resinosos, especialmente de seus componentes isolados ou em combinação, não está completamente esclarecido. Todavia, muitas pesquisas têm demonstrado e confirmado a atividade genotóxica e mutagênica de materiais resinosos<sup>9,24,25</sup>, seu intenso efeito citotóxico sobre cultura de células<sup>5,7,8,26</sup> e o efeito imunossupressor sobre células acessórias da polpa<sup>10</sup>. Recentes estudos têm demonstrado que materiais que contêm componentes resinosos, tais como etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e outros, podem exibir efeito genotóxico por causar danos ao DNA celular ou induzir expressão de protooncogenes através de ampla deleção na seqüência do DNA<sup>27-29</sup>. Por outro lado, o efeito citotóxico dos agentes adesivos e de seus componentes tem sido relatado, podendo ocorrer pela incorporação dos monômeros na bicamada de lipídio da membrana das células e resultando na solubilização dessa estrutura celular, levando a sérias alterações no metabolismo e/ou à morte das células<sup>30</sup>. Pesquisas atuais também avaliaram a depleção de glutadiona em fibroblastos incubados com extrato de alguns biomateriais, tais como resinas compostas, compômeros e cimentos de ionômero de vidro<sup>31</sup>. Os pesquisadores demonstraram que o potencial anti-oxidante de alguns precursores da glutadiona intracelular protege as células da ação tóxica dos componentes dos materiais dentários resinosos<sup>31</sup>. Assim, além do efeito de monômeros sobre a membrana celular, o estresse oxidativo induzido por esses componentes dos materiais resinosos assume papel importante no mecanismo de citotoxicidade<sup>31,32</sup>.

Na presente pesquisa, não foi avaliado o mecanismo de ação dos materiais experimentais. Todavia, as fotomicrografias obtidas em microscópio eletrônico de varredura para análise da morfologia celular claramente evidenciaram que a grande maioria das células foi letalmente afetada pelos agentes adesivos e acabou se deslocando do substrato de vidro. Apenas um reduzido número de células MDPC-23 que permaneceu aderido ao substrato não exibia evidente ruptura de membrana, porém apresentava forma arredondada e com poucos e curtos prolongamentos citoplasmáticos. Essas características morfológicas observadas nesses grupos experimentais são típicas de células em processo de morte por ação química direta de materiais resinosos<sup>6</sup>. Todavia, pode-se sugerir que as poucas células que ainda foram observadas sobre a lamínula de vidro foram aquelas responsáveis por 1% de respiração mitocondrial determinado pelo do teste de MTT. Apesar de a presente pesquisa não ter avaliado o potencial genotóxico/mutagênico e carcinogênico dos materiais experimentais e nem o mecanismo de ação sobre as células MDPC-23, foi possível demonstrar e comprovar dados científicos anteriores sobre os agentes adesivos serem materiais altamente tóxicos, cujas avaliações são de extremo interesse para a saúde pública. Dentro deste contexto, foi demonstrado que ambos os agentes adesivos avaliados foram altamente citotóxicos quando comparados ao hidróxido de cálcio.

As normativas da ANSI/ADA<sup>33</sup> e as diversas investigações realizadas nas últimas décadas demonstraram que resultados de investigações sobre a biocompatibilidade dos materiais dentários realizados em diferentes níveis de pesquisa (in vivo - em animais ou in vitro - em cultura de células) não podem ser extrapolados para situações clínicas em seres humanos<sup>33,34,35</sup>. Todavia, os testes de citotoxicidade em cultura de células podem determinar o potencial agressivo dos materiais sobre as células e direcionar os cuidados que devem ser tomados quando da utilização e recomendação de aplicação desses materiais em procedimentos clínicos. Com base nos dados científicos obtidos na presente pesquisa, foi possível concluir que os sistemas adesivos Clearfil Liner Bond 2V e Single Bond são os materiais com maior potencial citotóxico para as células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23, seguidos pelo hidróxido de cálcio, que apresentou discreta citotoxicidade.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Carl Thomas Hanks do Departamento de Oral Surgery, Oral Pathology and Oncology da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, USA, por fornecer as células MDPC-23 utilizadas no desenvolvimento da presente pesquisa. Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 302575/2004-9).



## Referências

- Hanks CT, Strawn RR, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991;70:1450-5.
- Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE. Delineation of cytotoxic concentration of two bonding agents in vitro. *J Endod.* 1992;18:589-96.
- Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Denninson JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res.* 1995;74:1602-6.
- Hashimoto M, Kaga M, Oguchi H. Cellular response to dentin-bonding composite resins with dentin disks using the agar overlay method. *Pediatr Dent.* 1997;7:103-7.
- MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Carnes DL. Immortalized odontoblast cell line MO6-G3 application for *in vitro* biocompatibility testing. *Am J Dent.* 1998;10:11-6.
- Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999;15:434-41.
- Geurtsen W, Lehmann F, Sphal W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resins composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res.* 1998;41:747-80.
- Kaga M, Noda M, Ferracane JH, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The *in vivo* cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effects on tyrosine phosphorylation of L929 cells. *Dent Mater.* 2001;17:333-9.
- Heil J, Reiffescheid G, Waldmann L, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res.* 1996;368:181-94.
- Jontell M, Hanks CT, Bratel J, Bergenholtz G. Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res.* 1995;5:1162-7.
- Noda M, Wataha JC, Lockwood PE, Volkman KR, Kaga M, Sano H. Sublethal, 2-week exposures of dental materials components alter TNF- $\alpha$  secretion of THP-1 monocytes. *Dent Mater.* 2003;19:101-5.
- MacDougall M, Resendez R, Reyna J, et al. Expression of dentin extracellular matrix proteins by odontoblastic cell cultures. In: Slavkin H, Price P. *Chemistry and biology of mineralized tissues.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 117-24.
- Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992;37:1045-55.
- Kasugay 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;33:887-91.
- Kawase T, Orikasa M, Suzuki A. A clonal prostaglandin-responsive cell line (RDP 4-1) derived from rat dental pulp. *Bone Miner.* 1990;11:163-75.
- MacDougall M. Odontoblast cytodifferentiation in monolayer cell cultures: establishment of immortalized odontoblast cell lines. In: Shimono M, Maeda T, Suda H, editors. *Proceeding of the International Conference on the dentin/pulp complex 1995 and the International Meeting on clinical topics on the dentin/pulp complex.* Berlin: Quintessence Publishing; 1996. p. 116-24.
- Hanks CT, Sun ZL. Comparison of growth characteristics of cloned odontoblast-like cells (MDPC-23) derived from CD-1 fetal mouse molar dental papillae. In: Shimono M, Maeda T, Suda H, editors. *Proceeding of the International Conference on the dentin/pulp complex 1995 and the International Meeting on clinical topics on the dentin/pulp complex.* Berlin: Quintessence Publishing; 1996. p. 319-20.
- Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998;37:233-49.
- Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Bègue-Kirn C, Wataha JC, et al. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res.* 1998;37:251-61.
- Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent.* 2001;14:25-30.
- 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;28:365-70.
- Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing of direct pulp capping studies. *Am J Dent.* 1998;11:S17-S34.
- Schöroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res.* 1985;64:541-8.
- Schweickl H, Schmalz G, Gottke C. Mutagenicity of various dentin bonding agents. *Biomaterials.* 1996;17:1451-6.
- Schweickl H, Schmalz G. Glutaraldehyde-containing dentin bonding agents are mutagen in mammalian cells in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1997;36:284-8.
- Hashie A, Cosset A, Franquin JC, Camps J. In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *J Endod.* 1999;25:89-92.
- Tai KW, Huang FM, Huang MS, Chang YC. Assessment of genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol based root canal sealers employing in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res.* 2002;59:73-7.

28. Huang FM, Hsieh YS, Tai KW, Chou MY, Cahng YC. Induction of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes expression by formaldehyde-releasing and epoxy resin based root canal sealers in human in human osteonlastic cells. *J Biomed Mater Res.* 2002;59:460-5.
29. Huang FM, Ming YC, Chang YC. Dentin bonding agents induce *c-fos* and *c-jun* protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2003;24:157-63.
30. Fujisawa S, Kadoma Y. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethylene-glycol dimethacrylate with phospholipid liposome as a model system for odontoblast membrane. *J Dent Res.* 1998;67:1438-41.
31. Stanislawski L, Soheili Madj E, Goldberg M. Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblasts; protective effect of N-acetyl cysteine *J Biomed Mater Res.* 2000;51:469-74.
32. Soheili Madj E, Goldberg M, Stanislawski L. In vitro effects os ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials.* 2003;24:3-9.
33. American National Standards Institute. American Dental Association. Document N° 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc.* 1979;99:697-8.
34. Wenneberg A, Mjör IA, Hensten-Pettersen A. Biological evaluation of dental restorative materials: a comparison of different test methods. *J Biomed Mater Res.* 1983;17:23-36.
35. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with adhesive systems, a review. *Dent Mater.* 2000;16:188-97.