AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E SORÇÃO E SOLUBILIDADE DE TRÊS SISTEMAS ADESIVOS AUTOCONDICIONANTES.

RIBEIRO, Juliana[1]; PERALTA, Sonia Luque[2]; PIVA, Evandro[3]; LUND, Rafael Guerra[4].

[1] Acadêmica do curso de Graduação em Odontologia UFPel; [2]Acadêmica do curso de Pós-graduação em Odontologia (PPGO)-UFPel.[3] Professor da Faculdade de Odontologia de Pelotas FOP-UFPel
[4]Orientador e professor da FOP-UFPel.
jujusilvaribeiro@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos são materiais poliméricos compostos basicamente de: HEMA (2-hidroxietil metacrilato), TEGDMA (trietileno glicol dimetacrilato) e outros monômeros, fotoiniciadores, solventes e aditivos (MOSZNER et al. 2005). Os sistemas adesivos se apresentam disponíveis no mercado em duas versões: convencionais e autocondicionantes, sendo estes últimos os mais modernos. Os autocondiconantes se diferenciam dos convencionais por que não requerem a etapa de condicionamento ácido, previamente ao procedimento adesivo, visto que apresentam monômeros ácidos na sua formulação. Os sistemas adesivos autocondicionantes promovem a desmineralização dentinária e a infiltração simultaneamente (Carvalho et al. 2005). A capacidade de dissolução da lama dentinária e desmineralização da dentina subjacente tem sido relacionada com o seu pH (PERDIGÃO, 2007).

No entanto, há poucos estudos sobre a biocompatibilidade dos sistemas adesivos autocondicionantes. A avaliação da citotoxidade e da genotoxidade é pré-requisito para a avaliação de biocompatibilidade dos materiais.

Além disso, a avaliação do material por ensaios de citotoxidade, genotoxidade, e sorção e solubilidade é essencial se considerarmos que os adesivos vão ficar em contato direto com a dentina vital e o tecido pulpar (DEMIRCI et al., 2008) e que fatores de agressão ao tecido pulpar após a restauração são a liberação de componentes oriundos dos materiais restauradores ou forradores em contato direto ou indireto com o fluido dentinário e a polpa(HANKS et al 1991).

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxidade, a genotoxidade e a sorção e solubilidade de três sistemas adesivos autocondicionantes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Foram utilizados neste estudo três produtos de marcas comerciais: Clearfil Protect Bond(CPB)/ Kuraray Osaka, Japão, Clearfil Se Bond(CSEB), /Kuraray Osaka, Japão , e Adper SE Plus(AP)/3M ESPE Maplewood, EUA.

2.1 Cultivo celular

O meio de cultivo celular utilizado para citotoxidade e genotoxidade foi o DMEM com suplemento de 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de penicilina 10.000u/mL e estreptomicina 10.000µg/mL. A linhagem imortalizada de fibroblastos 3T3/NIH utilizada para os ensaios foi suspendida em meio de cultura DMEM e incubada em estufa a 37ºC por 24h.

2.2 Ensaio de citotoxidade (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), por meio da enzima

mitocondrial desidrogenase succínica, a cristais de formazan de cor azul-púrpura que se acumulam no citoplasma celular. Em placas de 96 poços, foram colocadas $1x10^4$ células suspendidas em 200µL DMEM por cavidade. A placa foi incubada (37ºC, 5% de CO_2) por um período de 24 h. Após esse período, os meios foram aspirados e as células lavadas com PBS para logo serem expostas aos produtos-teste, sendo as misturas de reação armazenadas por 24h em estufa a 37^{o}C permitindo que produtos atuassem na monocamada celular.

Após 24 h, o meio com os produtos-teste de cada poço foram aspirados. Foi preparada uma solução de MTT que foi adicionada a cada poço e incubados novamente por 6h de forma a permitir o metabolismo do MTT. Passado o período, o meio foi sugado e os cristais de formazan foram ressuspendidos em 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO).

Os resultados foram lidos em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 560 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular (KOULAOUZIDOU, 2009; FERNÁNDEZ, 2010).

2.3 Ensaio de genotoxidade

Para o ensaio de genotoxidade, foi utilizado o teste de micronúcleos (MN) que identifica estruturas contendo DNA dentro do citoplasma da célula, separadas do núcleo principal caracterizando algum dano genético celular pela coloração da técnica de Feulgen, que consiste na pigmentação de todos os elementos celulares que contenham DNA, o qual, após hidrólise ácida moderada, quando tratado pelo reagente de Schiff, dá lugar à formação de um produto que cora num tom de vermelho arroxeado(KASTEN 2003).

Em placas de 24 poços, foram colocadas lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro, em cada poço foram adicionadas $4x10^4$ células em 400 µl de meio de cultura. As placas contendo as lamínulas e as células ficaram em estufa em 5% de CO_2, com 95% O_2, à 37°C. Após 24h, o meio foi retirado dos poços e, adicionados 400 µl/poço de cada material teste.

Após esse tempo as lamínulas foram lavadas e fixadas. As placas foram levadas ao freezer -20°C por 30 min e, passado este período, foi removido e adicionado 1ml/poço de HCl (ácido clorídrico 1N / Synth) à temperatura ambiente por 1 min. Removido o HCl foi adicionado novamente 1 ml/poço de HCl pré-aquecido à temperatura de 63°C e mantido em estufa (FANEM) de 60°C por 10 min. Após, foi removido novamente e adicionado 1ml/poço de água destilada . Foram adicionados a cada poço 1 ml da solução de Schiff por 2,30 min à temperatura ambiente em ambiente escuro e, logo após, o reagente removido e as lamínulas foram lavadas e armazenadas, 24 h após, as lamínulas foram imersas no corante *Fast Green*, lavadas, e novamente se deixou por 24 h para secagem finalmente as lamínulas foram fixadas em lâminas histológicas. As laminas foram lidas em microscópio óptico comum com objetiva de 40x e oculares de 10x em lâminas. A determinação da proporção de micronúcleos foi feita mediante a contagem manual de células micronucleadas em 1000 células por lamínula.

Os critérios utilizados para caracterizar a formação dos micronúcleos foram os seguintes: (a) ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula; (b) apresentarem coloração semelhante ao núcleo principal; (c) seu diâmetro deve ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) estar no mesmo plano de foco do principal; (e) estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos (COUNTRYMAM, HEDDLE, 1976).

2.4 Sorção e solubilidade em água

O preparo dos espécimes foi feito em um molde com dimensões internas de 6 ± 0,1mm de diâmetro e 1,0 ± 0,1mm de espessura. Sob o molde posicionou-se uma lâmina de poliéster, sobre uma placa de vidro. O material foi inserido no molde e outra lamina de poliéster juntamente com uma lamina de vidro foi posicionadas e pressionadas para escoar o excesso de material. Após a remoção dos excessos, o espécime foi fotoativado, através da lâmina de vidro por 40s.

Os espécimes foram colocados em um "dessecador" contendo sílica e armazenados em estufa a 37°C. As massas mensuradas até sua estabilização. Sendo denominada de m1, pois representa a massa seca do espécime antes dos fenômenos de sorção e solubilidade ocorrerem.

Após a definição da m1, todos os espécimes de um mesmo grupo foram armazenados individualmente dentro de um recipiente contendo 10 ml água destilada. Os recipientes foram armazenados dentro da estufa, e após uma semana a massa de todos os espécimes foi mensurada novamente, sendo denominada de m2, pois representa a massa úmida do espécime após este ter sorvido água do meio em que foi armazenado.

Em seguida, os corpos de prova foram armazenados novamente no "dessecador", e na estufa, a fim de adquirir uma terceira massa (m3), massa esta que representou a massa final do espécime após o fenômeno de solubilidade. Após a estabilização desta massa, a m3 de cada corpo de prova foi mensurada.

A Sorção de água (WS) e a Solubilidade (SL) foram calculadas a partir das seguintes fórmulas: $WS = (m2 – m3) / V$, $SL = (m1 – m3) / V$,

Onde V representa o volume dos espécimes, obtido da seguinte maneira:

$V = \pi R^2 h$

Onde π representa o valor constante de 3,14; R o raio do espécime; e h a altura do mesmo. O raio é obtido através da média entre dois diâmetros perpendiculares de cada espécime; e a altura será obtida pela média entre cinco alturas diferentes para cada um dos espécimes (MALACARNE et al, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da citotoxidade, observou-se que todos os materiais causaram morte celular. Quando avaliados os *primers*, nota-se que o AP foi o menos citotóxico. A baixa citotoxidade do *primer* do AP poderia ser explicada pela sua composição, já que o primer na sua composição apresenta ácido fosfórico, água, surfactante e corante. Já os outros dois *primers* testados apresentam em sua composição diferentes materiais como o Bis-GMA (VAN LANDUYT et al, 2007).Porém, quando avaliados os *bonds*, AP foi o mais tóxico. Isto poderia ser ocasionado, pois possui na sua composição o UDMA e HEMA (VAN LANDUYT et al, 2007).

Diversos estudos *in vitro,* indicam que o Bis–GMA e o UDMA são fortemente tóxicos, seguidos pelo HEMA e TEGDMA. (GEURTSEN et al, 1998; RATANASATHIEN et al, 1995).

Na genotoxidade, observou-se que todos os materiais testados apresentaram efeito genotóxico similar. Os resultados encontrados para a genotoxidade foram diferentes daqueles encontrados no estudo de DEMIRCI et al. (2008), em que o primer e o bond do Clearfil Protect bond não foram genotóxicos. Por outro lado, isso poderia ser explicado porque foi empregada uma metodologia diferente naquele estudo.

Para a sorção e solubilidade, o AP apresentou maior sorção e solubilidade em água. Isso poderia ser explicado porque na sua composição, talvez haja grande quantidade de monômeros hidrofílicos e estes poderiam se degradar e quebrar as cadeias poliméricas ocasionando, desta forma, a maior solubilidade.

4 CONCLUSÕES

1) A maioria dos adesivos autocondicionantes mostraram efeitos citotóxicos sobre os fibroblastos, exceto o primer do AP. Por outro lado,o bond do AP foi o mais citotóxico; 2) Com relação à genotoxidade, esta foi semelhante para todos os grupos testados; 3) O Adper SE Plus foi o que apresentou maior sorção e solubilidade.

5 REFERÊNCIAS

DEMIRCI M, HILLER KA, BOSL C, GALLER K, SCHMALZ G, SCHWEIKL H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. **Dental Materials**. v.24, p.362-371, 2008.

FERNÁNDES MR, CARVALHO RV, OGLIARI FA, BEIRA FA, ETGES A, BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth, **International Endodontic Journal**. v.43, p.102-108, 2010.

GEURTSEN W, LEHMANN F, SPAHL W, LEYHAUSEN G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. **Jornal of Biomedical Materials Research**; v.41 p.474–480,1998.

HANKS CT, WATAHA JC, PARSELL RR, STRAWN SE, FAT JC. Delineation of cytotoxic concentrations of to dentin bonding agents *in vitro*. **Journal of Endodontics**. v. 18, n. 12, p. 589-596, 1992.

KOULAOUZIDOU EA, HELVATJOGLU M A, PALAGHIAS G, KARANIKA-KOUMA A, ANTONIADES DJ. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. 84(1):271-6, 2008.

MALACARNE J, CARVAL HO RM, DE GOES MF,SVIZERO N, PASHLEY DH, TAY FR, YIU CK CARRILHO MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. **Dental Materials**. v.22 p.973-980, 2006.

MOSZNER N, SALZ U, ZIMMERMANN J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. **Dental Materials**. v.21 p.895-910, 2005.

PERDIGÃO J. New developments in dental adhesion**. Dental Clinics of North America**. v.51 p.333-57, 2007.

RATANASATHIEN S, WATAHA JC, HANKS CT, DENNISON JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **Jornal of Dental Research**. v.74 p.1602–6, 1995.

VAN LANDUYT KL, SNAUWAERT J, DE MUNCK J, PEUMANS M, YOSHIDA Y AND POITEVIN A et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. **Biomaterials.** v.28 p.3757–3785, 2007.

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**. v.26 p.1035–42, 2005.