Célia Regina Moreira Lanza

Difusão Transdentinária e Citotoxicidade de Sistemas Adesivos Autocondicionantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como pré-requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profª. Drª. Josimeri Hebling

Araraquara

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Célia Regina Moreira Lanza

Difusão transdentinária e citotoxicidade de sistemas adesivos autocondicionantes

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profª Drª Josimeri Hebling

2º Examinador: Prof. Dr. Roberval de Almeida Cruz

3º Examinador: Prof. Dr. José Carlos Pereira

4º Examinador: Profª. Drª Elisa Maria Aparecida Giro

5º Examinador: Prof. Dr. Carlos Alberto dos Santos Cruz

Araraquara, 06 de julho de 2007.

DADOS CURRICULARES

CÉLIA REGINA MOREIRA LANZA

Nascimento	01/01/1965, Belo Horizonte, MG
Filiação	Maria Celeste Amato da Silva Raimundo Moreira da Silva
1983 a 1987	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da UFMG
1993 a 1994	Especialização em Endodontia pela FOB – USP
1994 a 1995	Especialização em Odontopediatria pela FOB – USP
1995 a 1997	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria – nível Mestrado na Faculdade de Odontologia de Bauru -USP
1999	Professora Assistente da FOUFMG – Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica
2001	Professora Assistente da PUC-Minas – Departamento de Odontologia Infantil
2003-2007	Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de concentração Odontopediatria, nível Doutorado na Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr – UNESP
Associações	Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria Associação Mineira de Odontopediatria – AMO/MG Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO

DEDICATÓRIA

Dedico este Trabalho....

À Deus, que tudo proporciona e conduz, e com toda sua força mostra sempre o melhor caminho a seguir, protege e abençoa.

Aos meus filhos, **Vinícius e Luíza,** sinônimos de amor, ternura e alegria, meu maior estímulo pessoal e profissional.

Ao querido Lincoln, companheiro de todas as horas, firme ao meu lado me demonstrando seu amor e seu apoio na realização de mais este sonho.

Aos meus pais, **Raimundo e Celeste,** exemplos de vida, generosidade, honestidade e amor. Sempre humildes e fiéis para todo e qualquer momento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profª. Josimeri**, pessoa especial e querida, que com a serenidade das pessoas de bem sabe trilhar os caminhos científicos com honestidade e dedicação, sem perder sua doçura e amor à família. Obrigada pelo exemplo, pelos ensinamentos, pelo companherismo em todas as etapas do trabalho, pela amizade e pelas inúmeras oportunidades de crescimento pessoal e profissional ao seu lado.

Ao Profº. e amigo **Carlos Alberto**, colaborador deste trabalho em todos os momentos, meu respeito e admiração. É um exemplo raro de liderança, seriedade e trabalho em equipe. Obrigada por ter me acolhido tão bem em seu departamento e me proporcionado grandes oportunidades de estudo, aprendizado e pesquisa.

À toda minha família, irmãs e irmãos, cunhados, sobrinhos e afilhados pelo carinho e apoio sempre incondicional.

À família Lanza, minha sogra Elza, cunhadas, cunhados e sobrinhos sempre me estimulando e encorajando na busca de meus objetivos.

À querida Profª Elisa, exemplo de dedicação e simplicidade, presença marcante nesta minha jornada, sempre amiga e prestativa.

Ao Profº Ricardo Marins, grande amigo e exemplo profissional, pelos conselhos e troca de idéias durante a elaboração do projeto e por ter disponibilizado o aparelho Flodec de seu núcleo de pesquisa, tão importante na execução do experimento.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro, meu respeito e gratidão pelos ensinamentos e pela convivência sempre agradável e amiga.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista na pessoa do Magnífico Reitor Marcos Macári e Vice-Reitor Herman Jacobus Cornelius Voorwald.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara representados pela Digníssima Diretora Profª. Drª. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio e pelo Vice-Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Concentração Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, na pessoa da Profª Drª Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À Faculdade de Odontologia da UFMG, na pessoa do Ilmo Diretor Prof. Dr. Wellington Corrêa Jansen e do Prof. Evandro Abdo, Chefe do Departamento CPC, pela pronta liberação de minhas atividades para cursar o doutorado, e todos os colegas do CIAP I e II.

À Faculdade de Odontologia da PUC-Minas, na pessoa do Ilmo Diretor Félix Araújo, Ilma Coordenadora da Graduação Profª. Franca Arenare Jeunon, ao programa PPCD e demais professores do Departamento de Odontologia Infantil.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Aos professores convidados do Programa de Doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Celinha, Soninha, Odete, Tânia, Dulce, Silvia, Regina, Cris, Toninho, Pedrinho pelo auxílio e amizade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP, na pessoa da Profª. Drª. Maysa Furlan e Drº Alberto Alécio pela realização das análises químicas deste trabalho.

Ao NAP/MEPA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – USP, na pessoa do Prof. Dr. Elliot W. Kitajima, pela oportunidade de realização de cursos e análises de microscopia eletrônica de varredura.

À Profª. Drª. Iracilda Zeppone Carlos do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio e disponibilização do equipamento para leitura do metabolismo celular.

Ao amigo e cirurgião-dentista Adriano Campos Teixeira pela coleta dos dentes utilizados na pesquisa.
Aos funcionários da Biblioteca: Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena, Maria Inês, Marley, Cristina, Aparecida, Odete e Silvia, pela amizade e atenção.

Ao amigo e colega Prof. Ricardo Vaz pela auxílio com as análises microscópicas Aos funcionários da Secretaria de Pós – Graduação da

Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Mara, Rosângela, Vera, Sylvia e Alexandre, sempre atenciosos e amigos.
A pós-graduanda Safira Marques de Andrade e Silva, da FOB-USP pelo indispensável auxílio com o Flodec, e também pela sua amizade e carinho.

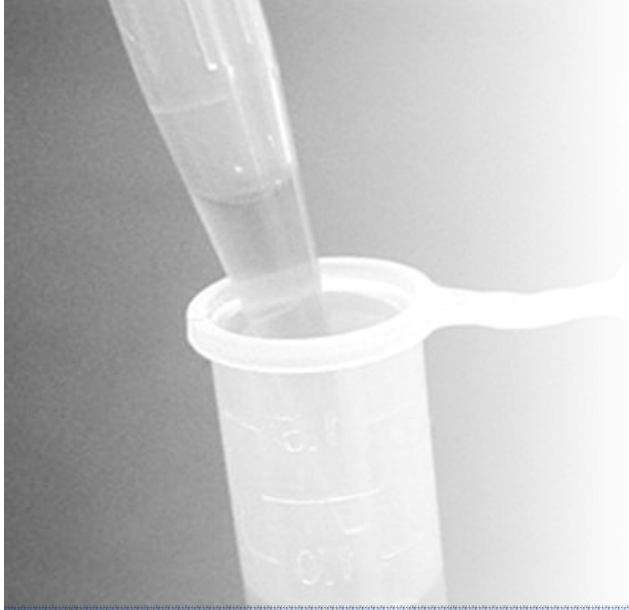
Aos colegas e amigos da pós-graduação: Cris Motisuki, Cris Duque, Renata, Ticiana, Juçaíra, Paulinha, Pedro, Murilo, Érika, Emi, Fabíola, Hermes, Fábio, Jonas, Júnia, Luciana, Andreza, Fernanda, Michele, Carmen, Juliana, Nancy e Simone e também as estágiárias da Odontopediatria, pela convivência agradável e troca de experiências.

Ao grupo de estudos da Patologia Experimental: Lorena, Kina, Adriano, Pedro, Claudia Huck, Juliana Gondim, Nancy, Betinho, Patrícia, Luciana, Sabrina, Giovanni, Mariana, Júnia, Camila, Andreza, Fernanda, pelas inúmeras discussões científicas e partilha de idéias e anseios.

Àqueles que mais que colegas, marcaram esta jornada com inesquecível amizade: Paulinha, Lorena, Murilo, Érika, Juliana, kina, Adriano, Emi, Fábio, Lu, Cris, Claudia Huck, Glorinha e Dani Zandim.

Aos amigos de sempre, conquistados pela vida à fora e que tenho certeza torceram por mim e compartilham comigo esta importante conquista.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... 16

RESUMO 21

ABSTRACT 24

1 INTRODUÇÃO 27

2 REVISÃO DE LITERATURA 33

3 PROPOSIÇÃO 71

4 MATERIAL E MÉTODO 73
- 4.1 Obtenção dos discos de dentina 73
- 4.2 Determinação da permeabilidade dentinária 76
- 4.3 Cultivo das células odontoblastóides sobre o disco de dentina..... 79
- 4.4 Aplicação dos sistemas adesivos 83
- 4.5 Avaliação do metabolismo celular 85
- 4.6 Análise de microscopia eletrônica de varredura 88
- 4.7 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas(CG/EM) 89
- 4.8 Tratamento estatístico dos dados 91

5 RESULTADO.. 93

6 DISCUSSÃO 110

7 CONCLUSÃO 127

REFERÊNCIAS 129

ANEXOS 140

LISTAS
(Abreviaturas, siglas e símbolos)

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

α- MEM – meio de cultura

ΔP – gradiente de pressão

µg - micrograma

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µL/min – microlitro por minuto

^{0}C – grau Celsius

3G – trietilenoglicol dimetacrilato

A – área de superfície

Balb/c 3T3 – linhagem celular de fibroblastos de rato

BEA – benzil álcool

BEMA – benzil metacrilato

BHT – tolueno hidroxil butilado

BisEMA – bisetil metacrilato

BisGMA – bis glicidil metacrilato

BisMA – bisfenol-A-dimetacrilato

BME – benzóico ácido metilester

cel/cm^2 – células por centímetro quadrado

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CG/EM – cromatografia gasosa e espectrometria de massas

CLAE – cromatografia líquida de alta especificidade

cm – centímetro

cm^2 – centímetro quadrado

CO_2 – gás carbônico

CQ - canforoquinona

DCF – teste diclorofluoresceína

DDMA – 1,10 decanodiol dimetacrilato

DEAE – dietil-amino-etanol

DEGDMA – dietilenoglicol dimetacrilato

DICH – diisocianato-hexano

DMAPE – dimetil-aminofenil-etanol

DMBZ - dimetoxibenzoína

DMEM – *Dubelco's Modified Eagle's Medium* (Meio de cultura modificado Dubelco)

DMPT – fotoiniciador dimetil-p-toluidina

DMSO – dimetilsulfóxido

DMTDA – N,N dimetiltetradecilamina

DNA- ácido desoxiribonucléico

DPICI – *diphenyliodoniumchloride*

DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Exploratória Diferencial)

ED_{50} – dose necessária para reduzir o número de células viáveis a 50% do controle

EDTA – ácido etil diamino tetracético

EG - etilenoglicol

EGDMA – etilenoglicol dimetacrilato

EMA – etil metacrilato

FGH – fibroblastos gengivais humanos

FLPH – fibroblastos do ligamento periodontal humano

FPH – fibroblastos pulpares humanos

g - grama

GDMA- glicerol dimetacrilato

h – hora

H_2O – água

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

HeLa S3 – linhagem de fibroblastos

HEMA – 2- hidroxietil metacrilato

HMBP – 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona

HMDS – 1,1,1,3,3,3 – hexametildisilazano 98%

IC_{50} - concentração inibitória para 50% das células

ID_{50} – dose letal para 50% das células (dose considerada tóxica para as células pulpares)

IU/mL – *Internacional Unit* por mililitro

IVPC – *in vitro pulp chamber* (câmara pulpar in vitro)

J 774A1 – linhagem de macrófagos

JΔ - volume de fluido

JAC – junção amelo cementária

KPa – quilopascal

L929 – linhagem de fibroblastos

log P – coeficiente de partição (mede a hidrofobicidade da molécula)

Lp – condutância hidráulica

MAP – proteína ativada por mitógeno

MDP – fosfato metacrilado insaturado

MDPB – 12-metacriloiloxi-dodecilpiridinium brometo

MDPC-23 – *mouse dental papilae cells* (células da papila dentária de ratos)

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV- microscopia eletrônica de varredura

mg – miligrama

mg/mL – miligrama por mililitro

min - minuto

mL - mililitro

mL/h – mililitro por hora

mL/min – mililitro por minuto

mm – milímetro

mM - milimolar

mm^2 – milímetro quadrado

MMA – metil metacrilato

mmHg – milímetro de mercúrio

mmol/H – milimol por hora

mmol/L – milimol por litro

mOsm/kg – miliosmol por quilograma

MSDS – *Material Safety Data Sheet*

MTT – metiltetrazolium

MV – microdureza Vickers

mW - miliwatts

mw/cm^2 – miliwatts por cm^2

NAC – N-acetil-L-cisteína

NaCL – cloreto de sódio

nm – nanômetro

NPG – neopentilglicol

OsO_4 – tetróxido de ósmio

PBS – solução tampão fosfato

PEM-F – pentametacriloexietil ciclo fosfazen monoflúor

pH – potencial hidrogeniônico

Piro-HEMA – tetra-metacriloxietil pirofosfato

pKa – constante de dissociação ácida

PM – peça de mão

ROS – espécies de oxigênio reativo

SDH – enzima desidrogenase succínica

SDS-Page – *sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel eletrophoresis*

SFB – soro fetal bovino

t - tempo

TC_{50} – concentrações as quais causam 50% de toxicidade quando comparadas ao controle

TEG - trietilenoglicol

TEGDMA – trietilenoglicol dimetacrilato

TF – tampão fosfato

TMPTMA – trimetacrilato trimetilolpropano

TPSB - trifenilestíbano

UDMA – uretano dimetacrilato

UEDMA – uretano etil dimetacrilato

RESUMO

Lanza CRM. Difusão transdentinária e citotoxicidade de sistemas adesivos autocondicionantes [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

RESUMO

Este estudo avaliou a difusão transdentinária e a toxicidade de sistemas adesivos autocondicionantes de diferentes valores de pH sobre células odontoblastóides MDPC-23. Sessenta discos de dentina (0,4 mm de espessura) foram obtidos de terceiros molares humanos hígidos e divididos em 6 grupos após a mensuração de sua condutância hidráulica pelo Flodec. Os discos foram montados em câmaras pulpares *in vitro*, onde 30.000 células foram plantadas no seu lado pulpar (área dentina exposta 0,28 cm^2) e mantidas em cultura por 48 h. Após este período, os sistemas adesivos Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, Adper Prompt e Xeno III foram aplicados no lado oclusal dos discos. O sistema adesivo Single Bond foi usado como controle positivo e a solução tampão fosfato como controle negativo. A citotoxicidade foi avaliada após 24 horas pelo teste MTT e a morfologia celular por MEV. A difusão transdentinária foi qualificada por CG/EM. Os valores de MTT para os sistemas autocondicionantes, analisados pelos testes de Kruskall-Wallis e Mann-Whitney, foram estatisticamente diferentes do grupo controle negativo. Houve redução da viabilidade celular de 47,8%; 46,5%; 42,1% e 28,0% para o Clearfil SE Bond, Xeno III, Clearfil Protect Bond e Adper Prompt L-Pop, respectivamente. A redução da viabilidade celular foi

inferior ao Single Bond (53,1%) para todos os sistemas. A análise por CG/MS identificou o HEMA como principal componente químico difundido pela dentina. Foi possível concluir que todos os sistemas adesivos autocondicionantes avaliados apresentaram difusão transdentinária resultando em redução do metabolismo celular, a qual não foi relacionada a sua capacidade de dissolução da *smear layer* e desmineralização da dentina subjancente.

Palavras-chave: Dentina; cultura em câmaras de difusão; técnicas de cultivo celular; odontoblastos; cromatografia de gases e espectrometria de massas; adesivos dentinários autocondicionantes.

ABSTRACT

Lanza CRM. Transdentinal diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

ABSTRACT

This study evaluated the transdentinal diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems with different pH on the odontoblast cell line MDPC-23. Sixty dentin disks were cut from the crowns of extracted human permanent molar teeth with 0.4 mm thickness and were divided into 6 groups of similar hydraulic conductance (Flodec). The dentin disks were placed in an *in vitro* pulp chamber and 30.000 cells were planted on their pulpal side (area of exposed dentin 0.28 cm^2). After 48 hours, the adhesive systems Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, Adper Prompt or Xeno III were applied on the occlusal side and light-cured for 10s. Single Bond was used as positive and phosphate buffer solution (PBS) as negative control group. The cytotoxicity was measured by MTT assay and cell characteristics were assessed by SEM, after 24 h. The transdentinal diffusion was qualified by GC/MS. Kruskall-Wallis and Mann-Whitney tests demonstrated a significant difference among the adhesives and PBS ($p<0.05$). The cellular viability reduction promoted by the self-etching systems was lower than that of Single Bond (53,1%). Cell metabolism was reduced in 47,8%; 46,5%; 42,1% and 28,0% for Clearfil SE Bond, Xeno III, Clearfil Protect Bond and Adper Prompt, respectively. HEMA was identified as the main diffused

component. It was concluded that all investigated self-etching adhesives demonstrated transdentinal diffusion resulting in reduction of the cellular metabolism, which was not related to their capacity to dissolve the smear layer and demineralize the underlying dentin.

Keywords: Dentin; diffusion chambers; cell culture techniques; odontoblasts; gas cromatography and mass spectrometry; self-etching adhesive systems

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas adesivos dentinários vem sendo norteado, principalmente, pelo mercado de consumo e pela busca de melhorias físicas e mecânicas. Menores esforços têm sido dispendidos na adequação de suas propriedades biológicas, para que os mesmos possam ser aplicados com segurança, especialmente em situações onde existe uma grande proximidade ou mesmo contato direto com o tecido pulpar.

De maneira geral, os principais fatores agressivos ao tecido pulpar após procedimentos restauradores têm sido apontados como sendo a presença de microrganismos viáveis nas margens das restaurações e a liberação de componentes provenientes dos materiais restauradores/forradores, quer sejam aplicados em contato direto ou indireto em relação à polpa[31].

Resinas compostas e sistemas adesivos são materiais poliméricos de composição complexa, genericamente apresentando uma matriz orgânica polimerizável contendo um ou mais monômeros e/ou co-monômeros, e vários aditivos[24]. A liberação de componentes desses materiais ocorre via dois mecanismos preponderantes: (1) remoção por solventes, após a polimerização, de monômeros residuais não reagidos e/ou aditivos, e (2) formação de componentes passíveis de remoção pela água, como resultado da degradação ou erosão ao longo do tempo[24].

A composição e a quantidade de componentes liberados influenciam significantemente o comportamento biológico do

material restaurador/forrador[2,12,17,20,24,25,26,36,40]. Quando em contato direto com células do tecido pulpar, componentes provenientes de sistemas adesivos apresentam intenso efeito citopático[12,13,16,35,40]. Entretanto, a presença de dentina como barreira biológica, pode modificar a ação tóxica dessas substâncias devido às características inerentes a esse tecido[1,5,21,50,54], com destaque à sua permeabilidade e capacidade tampão.

Modelos in vitro têm sido constantemente aprimorados para a avaliação dos efeitos citopáticos de biomateriais, procurando mimetizar as condições encontradas in vivo. Dispositivos denominados câmara pulpar in vitro (*In vitro pulp chamber*)[31] têm sido utilizados para esta finalidade, permitindo a interposição de discos de dentina entre o material investigado e as células alvo, geralmente de linhagem fibroblástica, como L-929 e Balb/c 3T3[1,5,7,71]. Entretanto, com o desenvolvimento de células imortalizadas de linhagem odontoblastóide[34,43], as quais apresentam expressão gênica semelhante a de odontoblastos, tal como síntese de colágeno tipo I, sialoproteína e fosfoforina da dentina (e.g. MDPC-23, *Mouse Dental Papilae Cell*)[67], os resultados dos testes de citotoxicidade têm se aproximado dos prováveis efeitos in vivo.

A permeabilidade dentinária tem sido considerada um fator limitante da difusão de monômeros resinosos e outras substâncias. A difusão de uma substância através dos túbulos dentinários é dependente diretamente de sua concentração molar e inversamente de seu peso molecular[52]. Além do mais, as moléculas

difundidas podem interagir com componentes dos túbulos e ligar-se quimicamente à dentina[33]. Apesar disso, tem sido demonstrado que componentes liberados de sistemas adesivos e resinas compostas têm a capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários, in vitro e in vivo, e alcançar o espaço pulpar em concentrações consideradas tóxicas às células da polpa[4,5,10,17,22,23,28,29,32,36,71,73]. Também tem sido demonstrado que esses componentes são capazes de induzir a apoptose in vitro[2,11,44,49,61,64,65], entre outros eventos celulares e biológicos indesejáveis, tais como interferência na síntese de ATP[3], reações imunológicas[39] e alterações genéticas[42].

Como barreira de difusão, a dentina se distingue de outras barreiras biológicas por não apresentar área superficial de difusão constante[52]. Os efeitos nocivos pulpares de monômeros resinosos, assim como a permeabilidade dentinária, aumentam a medida que a espessura de dentina é reduzida, sugerindo que existe uma relação direta entre condutância hidráulica[ϕ] e difusão tubular. Discos de dentina que apresentam alta condutância hidráulica representam barreiras mais facilmente transponíveis, impondo pouca resistência à difusão de monômeros[1]. A difusão de monômeros específicos como HEMA (2-hidroxietil metacrilato) e TEGDMA (trietileno glicol dimetacrilato), os quais são componentes freqüentemente presentes em resinas adesivas e restauradoras, respectivamente, aumenta de forma substancial com a redução da espessura da

[ϕ] *medida que representa o volume de um líquido forçado por pressão que atravessa um disco de dentina, por unidade de área, unidade de tempo e unidade de pressão.*

dentina[29] uma vez que tanto a densidade como o diâmetro tubular aumentam à medida em que se aproximam do tecido pulpar.

Entretanto, sempre que a dentina é cortada, uma camada de restos teciduais contendo componentes inorgânicos e orgânicos é depositada sobre sua superfície, podendo ser considerada como um protetor natural do complexo dentino-pulpar[51]. Esta camada, denominada de *smear layer*, reduz a condutância hidráulica da dentina em 80-90%, porém reduz a difusão de solutos em apenas 25-30%[56]. Além disso, todos os sistemas adesivos contemporâneos removem completamente ou dissolvem a *smear layer*. Os sistemas convencionais, por exemplo, requerem o condicionamento da dentina com ácidos inorgânicos fortes previamente a sua aplicação, o que resulta na remoção completa da *smear layer* e ampliação da entrada dos túbulos dentinários, com conseqüente aumento da permeabilidade dentinária.

A utilização de monômeros ácidos na formulação de agentes adesivos possibilitou o desenvolvimento de sistemas autocondicionantes, onde a criação de vias de difusão (desmineralização dentinária) e a infiltração dessas vias ocorre simultaneamente. A agressividade desses sistemas, definida como a capacidade de dissolver a *smear layer* e desmineralizar a dentina subjacente, está diretamente relacionada ao seu pH[41,68].

Nos sistemas autocondicionantes, para que ocorra a ionização dos monômeros ácidos, a água passou a ser um constituinte imprescindível. A característica hidrófila resultante[45,69] propicia a eluição e difusão de seus componentes através dos

túbulos dentinários. Uma vez que estes materiais não são lavados da superfície dentinária e podem apresentar comprometimento do grau de conversão monômero-polímero devido ao grande volume de água/solvente inerente a sua composição[6,46], sugere-se que os mesmos possam, eventualmente, favorecer um efeito condicionante contínuo na camada de dentina subjacente[8,47], o que diretemante demonstra a presença de monômeros residuais não reagidos. No entanto, informações científicas sobre a citotoxicidade desses sistemas são exíguas na literatura.

REVISÃO LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A lixiviação de componentes dos materiais dentários exerce um importante impacto não só na estabilidade estrutural, mas também na compatibilidade biológica do material. Questões limitantes na avaliação dessa última propriedade, relacionadas a princípios éticos e complexidade dos eventos biológicos ocorridos in vivo têm norteado o desenvolvimento e aprimoramento de testes laboratoriais que permitam avaliações preliminares fidedignas.

Existe uma variedade de diferentes modelos de testes in vitro para a mensuração da citotoxicidade dos biomateriais. Estes incluem os testes de contato direto, onde os biomateriais contactam o sistema celular sem barreiras; o teste do extrato, onde os eluatos dos materiais são expostos às células e os testes de contato indireto, onde existe uma barreira entre os materiais e o sistema celular como uma camada de ágar, filtro miliporo ou dentina. A partir de 1974, com o desenvolvimento da primeira câmara pulpar in vitro (Outhwaite et al.[48], 1974) e com os testes de barreira dentinária, tem sido possível avaliar o efeito biológico protetor da dentina assim como a difusibilidade do material nesse substrato sob várias circunstâncias.

Hanks et al.[33] (1994) estudaram o fluxo de moléculas pela dentina humana e o efeito da espessura dentinária e do tamanho da molécula sobre esse fluxo. Concentrações padrões de

componentes de resina, proteínas sanguíneas (albumina, fibrinogênio e gama-globulina), peptídeos, fluoresceína, fenol e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram determinadas por espectrofotômetro de luz visível e ultravioleta, e aplicadas sobre discos de dentina humana montados em câmaras de difusão (Figura 1). A espessura dos discos foi de 0,34 mm; 0,47 mm e 0,8 mm com valores de condutância hidráulica (Lp) de 0,032; 0,030 e 0,009, respectivamente para todas as amostras, com exceção dos componentes de resina que foram aplicados em discos de espessura de 0,41-0,48 mm e Lp de 0,029-0,053. A solução solvente circulou lentamente através do lado oposto do disco de dentina a 0,5 mL/min, e o gradiente de difusão foi estabelecido dentro de 10-15 min no disco de dentina hidratado. Alíquotas de 100 µL das soluções contendo a difusão foram medidas espectro-fotometricamente. O coeficiente de permeabilidade de cada molécula foi usado para calcular a difusibilidade para cada espessura dentinária. A difusão foi indiretamente proporcional à espessura dentinária para todas as moléculas. A permeabilidade de difusão foi proporcional ao peso molecular exceto para a fluoresceína, o H_2O_2 e UDMA. Os componentes resinosos difundiram pelos discos de 0,5 mm, em concentrações inferiores às doses consideradas tóxicas para as células pulpares (ID_{50}). Porém, os autores ressaltaram que estas concentrações diluídas de resina podem causar outros efeitos biológicos, ou trabalhar em conjunção com produtos bacterianos ou outras moléculas (como o fenol e H_2O_2, por exemplo, que se difundiram prontamente pela

dentina) e agir aumentando ou diminuindo os efeitos tóxicos; além de poderem ser tóxicas em condições in vivo, onde podem permanecer em contato com células pulpares por várias semanas.

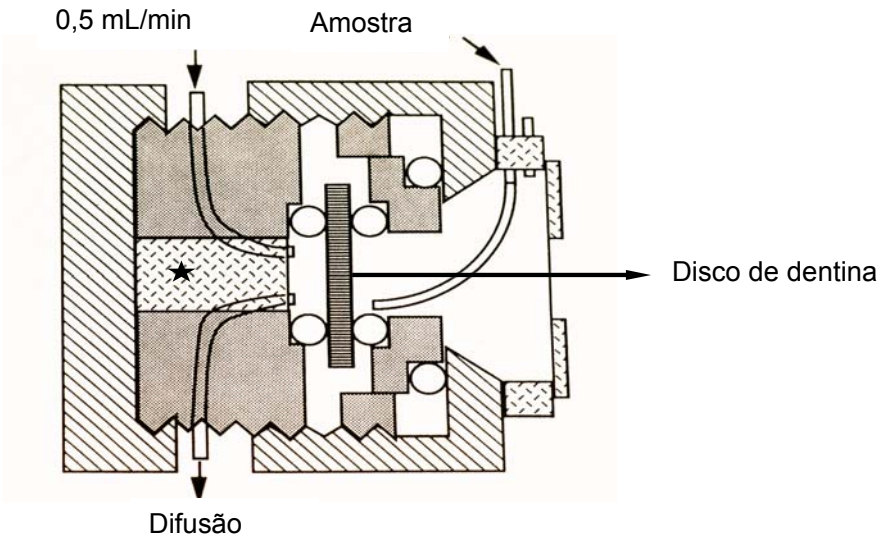


FIGURA 1 - Câmara de difusão. Área central da dentina de 0,29 cm^2. Volume do compartimento inferior de 45 µL (★).

Ratanasathien et al[59]. 1995 avaliaram a citotoxicidade de 4 componentes de sistemas adesivos dentinários isoladamente (HEMA, Bis-GMA, TEGDMA e UDMA) e em combinações binárias (HEMA/Bis-GMA, Bis-GMA/TEGDMA e TEGDMA/UDMA) com o ojetivo de determinar seus efeitos interativos. Culturas de células Balb/c 3T3 foram obtidas e expostas a várias concentrações de HEMA (dissolvido em 95% de água destilada estéril), Bis-GMA, UDMA e TEGDMA (dissolvidos em 95% de etanol). Um µL de água destilada e etanol foram usados como controle, respectivamente. A toxicidade foi

mensurada pelo teste MTT após 24 e 72h de contato determinando a concentração de cada componente necessária para produzir 50% de supressão celular (TC_{50}), por meio de uma curva dose-resposta. Os mesmos procedimentos foram repetidos para as combinações binárias, os quais determinaram os efeitos interativos calculando-se a diferença entre a toxicidade observada (MTT) e a toxicidade esperada (obtida pela densidade ótica das amostras-controle de cada componente, determinada na primeira parte do experimento). Se a diferença foi igual a zero representou um efeito aditivo (ou seja, zero de interação, apenas um somatório dos efeitos individuais), se menor que zero, um efeito sinérgico, e se maior que zero, um efeito antagônico. Os resultados mostraram que os valores de TC_{50} dos 4 componentes apresentaram a mesma seqüência de citotoxicidade para ambos tempos de exposição: Bis-GMA (mais citotóxico)>UDMA>TEGDMA>>>HEMA (menos citotóxico). Todos os 3 tipos de interações ocorreram e foram influenciados pela concentração de ambos componentes. No período de 24h, antagonismo foi dominante, mas com 72h o sinergismo aumentou consideravelmente, especialmente na combinação UDMA-TEGDMA. O sinergismo foi proeminente quando Bis-GMA estava presente a 25 µmol/L com qualquer concentração de HEMA, mas foi significante somente com 1000 a 2500 µmol/L de HEMA. Os autores concluíram que ambos, tempo de exposição e interações entre os componentes são importantes parâmetros na determinação da citotoxicidade de agentes adesivos in vivo, e uma vez que estas interações

ocorreram em concentrações as quais têm sido liberadas pelas resinas in vitro, elas podem ser relevantes para irritação pulpar in vivo.

Gerzina, Hume[23] (1996) examinaram a liberação e difusão transdentinária de monômeros presentes em resinas compostas, aplicadas isoladamente ou em combinação com sistemas adesivos. Cavidades oclusais foram preparadas em terceiros molares humanos recém-extraídos, após a remoção das raízes, deixando uma espessura média de dentina remanescente entre 1,6-2,0 mm. Um dispositivo de polietileno, preenchido com água destilada e simulando uma câmara pulpar foi conectado em cada dente na altura da junção amelo-cementária. Os dentes foram divididos em 4 grupos e receberam uma das combinações, Visar-Seal (Den Mat, Santa Maria, EUA) + Occlusin (GC, Tóquio, Japão), Scotchbond Multipurpose + Z100 (3M, St. Paul, MN, EUA) ou apenas restauração com uma das resinas compostas, Occlusin ou Z100. As amostras de água destilada foram removidas com 4,32; 14,4; 43,2; 144 e 432 minutos e 1, 3, 10, 30 e 100 dias e analisadas por cromatografia líquida de alta especificidade (CLAE). O TEGDMA foi detectado em todas as amostras de todos os grupos de dentes, mas somente após 43,2 min. Para a combinação SMP-Z100, o monômero HEMA também foi detectado. A combinação Visar-Seal + Occlusin resultou numa difusão significativamente mais alta nos períodos iniciais e uma média cumulativa também mais alta com 3 dias, sugerindo que as resinas de união tiveram uma contribuição

substancial na quantidade de monômeros detectados no espaço pulpar. Baseado nestes resultados, os autores sugeriram que a zona de interdifusão é permeável e não previne a passagem através da dentina de produtos tóxicos provenientes das resinas restauradoras.

Na tentativa de identificar as concentrações de componentes de materiais resinosos que podem causar citotoxicidade quando aplicados na dentina, Bouillaguet et al.[5] (1996) determinaram uma curva dose-resposta para o HEMA em contato direto com células in vitro. Dez concentrações de HEMA (variando de 0,01 a 100 mmol/L) foram testadas em cultura de fibroblastos de rato BALB/c por 12 ou 24 h e a viabilidade celular determinada pelo teste MTT. Os autores também investigaram a difusão do HEMA pela dentina em função da espessura, da condutância hidráulica e presença de pressão pulpar simulada. Discos de dentina, de 0,5 a 1,0 mm de espessura foram obtidos de molares humanos e montados em câmaras de difusão para cálculo de sua condutância hidráulica. Em seguida, as câmaras foram conectadas em espectrofotômetro (Figura 2) com um fluxo constante de 0,2 mL/min de água destilada, com uma pressão de 0 ou 10 cm de água, onde aplicou-se 0,1 mL de solução de HEMA (em concentrações de 80, 150 ou 375 mmol/L) no topo do disco de dentina. A difusão do HEMA através da dentina foi determinada pela medição da densidade óptica à 215 nm por 30 minutos. O HEMA, quando aplicado diretamente sobre as células, reduziu a respiração

celular proporcionalmente à sua concentração e tempo de exposição, sendo citotóxico entre 1 e 20 mmol/L. A concentração TC_{50} (concentração necessária para reduzir a atividade respiratória mitocondrial das células em 50%) foi 13 mmol/L após 12 h de exposição, caindo para 4 mmol/L após 24 h. O HEMA se difundiu rapidamente através da dentina, detectado após 3 min de aplicação, dependendo da concentração aplicada, porém não diretamente proporcional a ela. Sobre discos com 0,5 mm de espessura, na concentração de 375 mmol/L, a difusão do HEMA foi levemente maior que 150 mmol/L, a qual foi 3 a 4 vezes maior que 75 mmol/L. Quando a espessura dentinária aumentou de 0,5 para 1,0 mm a difusão do HEMA foi reduzida em 70%, e com o aumento da pressão de 0 para 10 cm de água a difusão diminuiu 5 vezes. Considerando-se os resultados deste experimento, o risco do HEMA causar citotoxicidade in vivo pode ser estimado. Se uma solução de 50% de HEMA (uma concentração comum nos adesivos dentinários equivale a 4,0 mmol/L) for aplicada em dentina condicionada de 1,0 mm de espessura por 30 min, a concentração pulpar estará entre 0,2 a 1,6 mmol/L, com risco de toxicidade baixo. Porém, se aplicados sobre discos de 0,5 mm, a sua concentração pulpar seria entre 0,6 e 3,6 mmol/L, a qual poderia causar uma resposta tóxica moderada após 12 h. Os autores concluíram que os riscos de citotoxicidade aguda ao HEMA parecem baixos, mas aplicações em dentina pouco espessa ou por longo tempo podem aumentar o seu potencial citotóxico. Além disso, outras reações adversas tais

como hipersensibilidade, ativação do complemento ou alterações de expressão de gene em odontoblastos não devem ser descartadas.

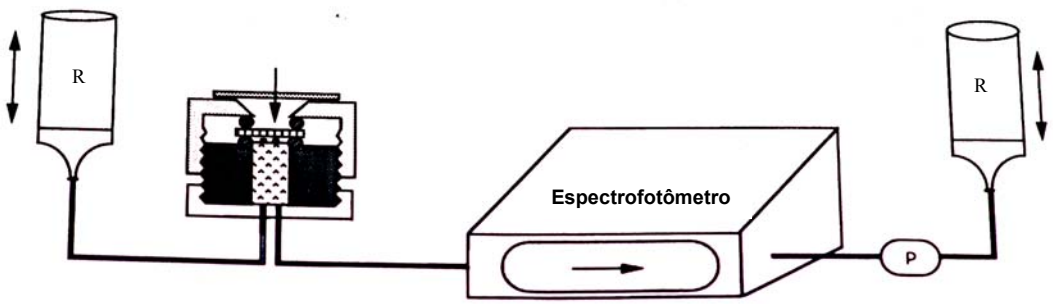


FIGURA 2 - Diagrama do sistema usado para medir a difusão da HEMA pela dentina. R – reservatório de pressão, P – bomba peristáltica.

Hamid, Hume[29] (1997), hipotetizando que a espessura da dentina influenciaria a quantidade de substâncias químicas que se difundem para o espaço pulpar, quantificaram a difusão de monômeros de uma combinação de resina composta e sistema adesivo em função do tempo. Cavidades oclusais foram preparadas em 40 terceiros molares humanos extraídos, após remoção de suas raízes, de maneira que o remanescente dentinário de cada dez dentes permaneceu entre 3,4-3,6 mm; 2,4-2,6 mm; 1,4-1,6 mm ou 0,4-0,6 mm de espessura. Cada dente foi montado em uma câmara de polipropileno, preenchida com água destilada e selada na junção amelo-cementária (Figura 3). As cavidades foram tratadas com ácido maléico 10% por 15 s e restauradas com resina Z100, aderidas com sistema adesivo Scotchbond Multipurpose. O conteúdo

das câmaras (eluatos) foi retirado nos períodos de 14,4; 43,2; 144 e 432 minutos; 1; 3; 10 e 30 dias e analisados por CLAE. Os monômeros foram identificados pela comparação com cromatogramas de padrões autênticos de HEMA e TEGDMA, e a média de liberação calculada pela quantidade liberada em função do tempo. Ambos HEMA e TEGDMA foram detectados nas câmaras pulpares em todos os grupos de dentes até o intervalo de 3 dias, em concentrações significantemente diferentes dependendo da espessura da dentina. Dentinas com menor espessura permitiram maior difusão de monômeros que as dentinas mais espessas. Nos intervalos iniciais (até 1 dia) o efeito da diminuição da espessura foi mais marcante para o HEMA do que para o TEGDMA. O Bis-GMA não foi encontrado nas amostras. Segundo os autores, a dentina menos espessa oferece uma proteção menor contra toxinas químicas provenientes dos materiais restauradores e o efeito da variação da espessura foi maior para substâncias de peso molecular menor, nas primeiras horas após a aplicação.

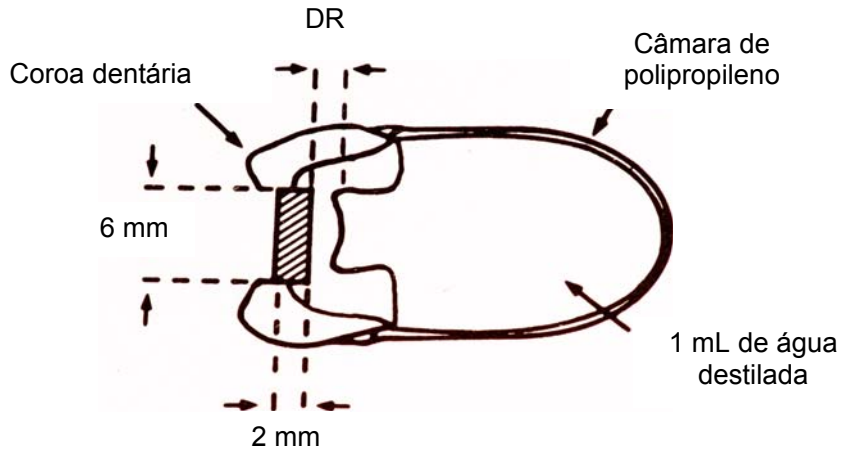


FIGURA 3 - Representação diagramática da câmara de polipropileno, contendo 1 mL de água destilada unida à coroa de um molar. DR – dentina remanescente.

Camps et al.[7] (1997) compararam a citotoxicidade de 2 sistemas adesivos dentinários, avaliando a influência da permeabilidade dentinária e da simulação de pressão pulpar pulsátil em dentes recém-extraídos e dentes criopreservados. Oitenta terceiros molares inclusos foram utilizados no experimento, sendo 40 frescos e 40 criopreservados em nitrogênio líquido a -180^{0}C entre 7 e 90 dias. Após a remoção das raízes, os dentes receberam preparos cavitários padronizados com 0,5 mm de dentina remanescente na parede pulpar e foram montados em câmaras pulpares in vitro. A condutância hidráulica foi determinada numa área de dentina de 18 mm^2 com uma pressão de 300 mm Hg, e os dentes divididos em 4 grupos de acordo com o material aplicado na cavidade: Scotchbond Multi-Purpose Plus e

resina Z100 (3M, St. Paul, MN, EUA); Optibond e resina Herculite (Kerr, Romulus, MI, EUA); controle negativo (sem material) e controle positivo (10 µL de fenol e cimento Cavit – ESPE, Seefeld, Alemanha). Vinte dentes frescos e 20 criopreservados foram usados para simulação de pressão pulpar (15 cm H_2O). A função respiratória de fibroblastos L929 cultivados com o meio que permaneceu em contato com a câmara pulpar dos dentes por 24 horas, foi comparada com o grupo controle. Nenhuma diferença significante foi encontrada na citotoxicidade de dentes frescos ou criopreservados. A citotoxicidade das resinas adesivas foi estatisticamente maior com simulação de pressão pulpar pulsátil e significantemente relacionada com a condutância hidráulica da dentina, num efeito dose-resposta. O controle positivo produziu a mais alta citotoxicidade, seguida pelas combinações de resina (sem diferença entre elas) e pelo controle negativo. Os autores concluíram que os dentes criopreservados podem ser utilizados em testes in vitro de citotoxicidade de resinas adesivas e que as simulações de pressão pulpar pulsátil aumentaram a citotoxicidade dos materiais testados.

Yoshii[74] (1997) investigou a toxicidade de trinta e nove acrilatos e metacrilatos, amplamente usados nos materiais resinosos, determinando a relação entre seus efeitos citotóxicos e sua estrutura química. Os monômeros hidrófilos foram dissolvidos diretamente em meio de cultura e os monômeros hidrófobos em meio de cultura adicionado de um agente

surfactante. Os extratos foram colocados em contato com cultura de células HeLa S3 por 24h e a citotoxicidade avaliada pelo teste MTT. Os acrilatos mostraram maior efeito tóxico que os metacrilatos correspondentes, efeito este dose-dependente. Quanto maior a cadeia alkil, maior foi a citotoxicidade de ambos, acrilatos e metacrilatos. Em ambos, o grupo hidroxil pareceu aumentar a citotoxicidade. A citotoxicidade de acrilatos e metacrilatos (com substituintes alkil) foi afetada pela sua lipofilia, ou seja, a capacidade de se incorporar na superfície de biomembranas lipídicas ou de solubulizá-las, diretamente relacionada com a função logP dos monômeros e inversamente com a IC_{50}. Uma correlação inversa foi observada nos etilmetacrilatos com substituintes éster, também explicada pela sua lipofilia. Entretanto, para os monometacrilatos com outros grupos funcionais, outros fatores, tais como carga elétrica foram dominantes. Nenhum efeito do tamanho da cadeia oxietilena nos valores IC_{50} de dimetacrilatos com 14 cadeias ou menos foi observado, mas aqueles com 23 cadeias foram os menos citotóxicos. Para os autores, os monômeros com cadeias polioxietilenas grandes foram impedidos de permear a membrana celular o que não foi afetado pelas cadeias menores. Porém, o efeito citotóxico desses dimetacrilatos menores, não influenciado pela cadeia oxietilena, relacionou-se com a estrutura molecular entre os grupos metacriloxil. Os IC_{50} do BisGMA, UDMA e NPG (neopentilglicol dimetacrilato) foram 0,03; 0,09 e 0,65 respectivamente, muito menores que dos

dimetacrilatos com cadeias oxietilenas. O ranking de citotoxidade encontrado entre os monômeros mais comumente usados nos materiais resinosos foi: BisGMA (bisfenol A bis 2-hidroxipropil metacrilato) > UDMA (uretano dimetacrilato) > TEGDMA > HEMA > MMA (metil metacrilato).

Abou Hashieh et al.[1] (1998) realizaram um estudo para testar a hipótese de que as resinas de união são mais citotóxicas quando aplicadas à dentina de alta condutância hidráulica. Discos de dentina de 0,5mm de espessura foram obtidos de terceiros molares humanos recém-extraídos, o mais próximo possível da câmara pulpar. A área central da dentina foi delineada em 50,24 mm^2. O lado pulpar ficou aberto à atmosfera e o lado oclusal conectado a um tubo capilar preenchido com água e contendo uma bolha de ar sob uma pressão hidrostática de 15 cm H_2O (1,47 KPa). O movimento do fluido foi calculado pelo deslocamento da bolha (Flodec – De Marco Engineering, Geneva) e determinou os valores de condutância hidráulica. Após separados em dois grupos, alta ($> 10^{-7} ms^{-1} KPa^{-1}$) e baixa condutância ($< 10^{-7} ms^{-1} KPa^{-1}$)os discos foram montados em um dispositivo usado para simular pressão pulpar pulsátil (12-18 cm H_2O). O compartimento inferior, em contato com o lado pulpar da dentina foi preenchido com meio de cultura e o lado oclusal recebeu a aplicação de um dos materiais: Scotchbond Multi-Purpose (3M, St. Paul, MN, EUA); Scotchbond One (3M, St. Paul, MN, EUA); All Bond 2 (Bisco Dental Products, Itasca, IL, EUA); All Bond One Step (Bisco Dental

Products, Itasca, IL, EUA), segundo recomendações do fabricante, os quais foram fotoativados por 40 segundos. Decorridas 24 horas, o meio de cultura em contato com o lado pulpar da dentina e que continha os componentes dos materiais que se difundiram foi coletado e colocado em contato com cultura de fibroblastos L929 por mais 24 horas. Quatro diluições foram testadas: não-diluído, 1:2, 1:10 e 1:100. A função respiratória das células foi determinada pelo teste MTT e comparada ao controle (meio de cultura em contato com o lado pulpar da dentina não tratada). A citotoxicidade dos 4 sistemas adesivos foi estatisticamente maior para os discos de alta condutância (Lp) quando utilizou-se o meio de cultura sem diluição. Para os meios diluídos, não houve diferença na citotoxicidade. Nenhuma diferença na citotoxicidade foi encontrada entre os sistemas adesivos. Este estudo mostrou que a permeabilidade dentinária pode modificar os resultados de testes de citotoxicidade in vitro, e que a citotoxicidade pode diminuir com a diluição, eliminando as diferenças entre os materiais adesivos.

Bouillaguet et al.[4] (1998) avaliaram a influência da permeabilidade dentinária na toxicidade de 4 sistemas adesivos dentinários, Aelitebond (Bisco, Itasca, IL.EUA), Optibond (Kerr, Romulus, MI, EUA), Prisma Universal Bond3 (DeTrey, Dentsply, Konstanz, Alemanha) e Scotchbond Multipurpose (3M, St. Paul, MN, EUA). Quarenta e oito discos de dentina de 0,5 mm de espessura foram obtidos da porção média da coroa de terceiros molares

humanos hígidos extraídos. Doze discos foram usados para cada material adesivo, divididos em 3 grupos após a mensuração da sua permeabilidade, baixa (0,14 ± 0,06 $x10^{-2}$ µL/min por cm^2 H_2O de pressão), média (1,14 ± 0,15$x10^{-2}$ por cm^2 H_2O de pressão) e alta (2,23 ± 0,41$x10^{-2}$ por cm^2 H_2O de pressão). Após a aplicação dos adesivos nos discos, os mesmos foram mantidos em contato com meio de cultura, o qual foi trocado a cada 24 h por 7 dias. Os eluatos obtidos nos diferentes intervalos de tempo foram colocados em contato com uma cultura de fibroblastos desenvolvida a partir de fragmentos de tecido pulpar de molares humanos jovens, por mais 24 horas. A viabilidade celular de cada grupo foi determinada pelo método MTT e comparada ao grupo controle (discos de dentina sem adesivos). Os resultados mostraram que todos os sistemas adesivos liberaram componentes em concentrações suficientes para causar supressão da atividade celular, sendo este efeito citopático foi diretamente afetado pela permeabilidade, embora não igualmente para todos os materiais. O tempo de liberação de componentes foi fator de grande importância na toxicidade destes sistemas, eluatos de intervalos menores (24-48h) foram mais citotóxicos que os obtidos após 96-120 e 120-144 horas. Os autores concluíram que a aplicação destes materiais na dentina, particularmente com alta permeabilidade, representa um risco potencial para a saúde pulpar.

Geurtsen et al.[25] 1998, investigaram a citotoxicidade de 35 componentes de resinas compostas, em culturas de fibroblastos 3T3 e 3 culturas primárias isoladas de tecidos orais, fibroblastos humanos gengivais (FGH), pulpares (FPH) e do ligamento periodontal (FLPH). Todos os componentes foram previamente analizados por CLAE/CGEM para verificação de impurezas e dissolvidos em DMSO em concentrações de 0,01-5,0 mM. As culturas foram obtidas e incubadas pelos componentes resinosos individuais por 24 h (3T3) e 48h (FGH, FPH, FLPH). Células tratadas com DMSO serviram como controle. Após o período de incubação, o conteúdo de DNA das células foi determinado com o corante H33342 (Riedel de Haen, Seelze, Alemanha) e os valores de ED_{50} (dose necessária para reduzir o numero de células viáveis a 50% do controle) calculados por regressão não linear. Os valores de ED_{50} de diferentes substâncias variaram consideravelmente entre 0,06 mM e >5 mM. As substâncias mais tóxicas foram os monômeros UDMA (ED_{50} 0,06-0,47 mM), Bis-GMA (ED_{50} 0,08-0,14 mM) e BisMA (ED_{50} 0,1-0,16 mM) e os comonômeros DEGDMA (ED_{50} 0,07-0,18 mM) e TEGDMA (ED_{50} 0,12-0,26 mM). O comonômero EGDMA (ED_{50} 0,46-2,31 mM) e os monômeros BEMA (ED_{50} 1,93-4,10 mM), HEMA (ED_{50} 1,77-2,52 mM) e DDMA (ED_{50} >5,0 mM) foram menos citotóxicos. O fotoiniciador DMBZ e o coiniciador DMTDA foram os mais citotóxicos do grupo. A CQ foi bem citocompatível em todas as linhagens de células, variando a ED_{50} entre 2,17-2,4 mM, assim como os coiniciadores DMPT, DEAE e DMAPE. O inibidor BHT, o contaminante TPSb e o fotoestabilizador

HMBP exibiram uma citotoxicidade severa em todas as culturas celulares. De uma forma geral, as substâncias criadas durante a polimerização ou decomposição do material tais como BEA, BME, DICH e TEG revelaram uma citotoxicidade moderada (ED_{50} 1,74->5,0 mM).

Com o objetivo de demonstrar os efeitos citopáticos in vitro de componentes polimerizados e não-polimerizados de adesivos de frasco único, Costa et al.[17] (1999) aplicaram 3 diferentes resinas adesivas em contato direto com células odontoblastóides MDPC-23. As células MDPC-23 (30.000 cel/cm^2) foram plantadas em compartimentos contendo lamínulas de vidro em sua base. Sobre elas foi colocado meio de cultura completo (α-MEM com 10% SFB suplementado com penicilina, streptomicina, e glutamina) com posterior manutenção em incubadora umidificada com 5% CO_2 e 95% de ar a 37^0C por 72 horas. Após este período, as células foram contadas usando um hematocitômetro e o meio de cultura substituído por outro contendo 995 µL de meio mais 5 µL de cada resina adesiva não polimerizada (Prime & Bond 2.1 – Dentsply, Konstanz, Alemanha; Single Bond – 3M, St. Paul, MN, EUA; Syntac Sprint – Vivadent, Schaan, Liechtenstein), mantidas em contato por mais 120 minutos. Em seguida, o meio foi novamente substituído por meio fresco por mais 4 horas. A solução salina tampão fosfato foi usada como grupo controle. Os escores obtidos das contagens das células foram analisados estatisticamente com comparações entre os grupos antes e após a

colocação do extrato adesivo. Adicionalmente, as características celulares foram analisadas por MEV. Para avaliar os efeitos citopáticos das resinas adesivas polimerizadas, 5 µL de cada material foi aplicado em filtros de papel de 7 mm de diâmetro e fotoativados por 20s. Após a polimerização, os adesivos foram lavados 3x com PBS e α-MEM com o objetivo de remover componentes não reagidos da superfície do material experimental e colocados em contato com a cultura de células. A atividade metabólica celular foi avaliada pelo teste MTT, a zona de inibição do material experimental medido por microscópio de luz invertida e a morfologia celular avaliada por MEV. Os resultados mostraram que todos os materiais não polimerizados foram citotóxicos quando comparados com o grupo controle e que esta citotoxicidade foi reduzida após a polimerização e lavagem dos componentes não reagidos. Mesmo após fotoativação, todos os materiais resinosos reduziram a respiração celular mitocondrial em torno de 50% e causaram similar zona de inibição. Os autores concluíram que todos as resinas adesivas avaliadas no estudo foram citotóxicas e que o emprego destes materiais como capeadores pulpares associados ao condicionamento ácido necessita ser reavaliado.

Geurtsen et al.[26] (1999) analisaram extratos aquosos de 5 sistemas adesivos dentinários, identificando os componentes liberados e correlacionando-os com seus efeitos citotóxicos sobre cultura de fibroblastos imortalizados 3T3. Amostras de Solobond Plus - SO (VOCO, Alemanha), Solist - ST (DMG,

Alemanha), Scotchbond Multi-Purpose - SB (3M, St. Paul, MN EUA), Syntac SC - SY (Vivadent, Schaan, Liechtenstein) e Prime & Bond - PB (Dentsply DeTrey, konstanz, Alemanha) foram fotopolimerizadas e mantidas por 24 h em água deionizada e meio DMEM para obtenção dos extratos. Os extratos aquosos foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM) e a quantidade relativa de seus componentes comparada a um padrão interno. Os extratos em meio de cultura foram colocados em contato com as células por 24 h e a citotoxicidade avaliada pelo conteúdo de DNA, determinado com o corante H 33342 (Riedel de Haen, Seelze, Alemanha). A citotoxicidade do etilenoglicol (EG, originado da decomposição do HEMA), em concentrações de 0,025 – 25 mM também foi determinada. Os resultados mostraram presença do HEMA nos eluatos do ST, SB, SY e PB (em quantidades maiores no SB e SY); EGDMA no ST, SB e SY e TEGDMA no SO, ST e SY. A canforquinona foi determinada em todos os extratos e o co-iniciador DMABEE no SO, SB e PB. Os extratos do SY continham ainda derivados do DPICI (*diphenyliodoniumchloride*), metacrilatos não identificados, e ácido metacrílico. Todos os extratos inibiram significantemente o crescimento das células 3T3, sendo as menores reduções para o PB e ST (16 e 8 %, respectivamente), cujos extratos continham pequenas quantidades de componentes químicos. Severos efeitos citotóxicos foram observados nos extratos de SO, SB e SY. O EG não afetou a proliferação celular. Os autores correlacionaram a extrema citotoxicidade do SO à

presença de altas quantidades de TEGDMA, e a severa citotoxicidade do SB e SY à quantidades significantes de HEMA e ressaltaram a evidência de que todos os adesivos testados liberaram componentes químicos em meio aquoso.

Imazato et al.[38] (2000) determinaram os efeitos citotóxicos de compósitos empregando *primers* autocondicionantes e *primers* experimentais contendo o monômero antibacteriano MDPB (12-metacriloyloxidodecil piridinium brometo). Os *primers* experimentais foram preparados adicionando-se o monômero MDPB no líquido B do *primer* do sistema adesivo Clearfil Liner Bond 2 – LB (Kuraray Co. Osaka, Japão) e no líquido A do primer da Panavia 21 - ED(Kuraray Co., Osaka, Japão)nas concentrações de 1,2 ou 5%. Discos de dentina (0,5 mm de espessura) foram obtidos de molares humanos e fixados em um tubo plástico simulando o teste de barreira dentinária (Figura 4). Os materiais teste e controle foram aplicados na superfície externa dos discos e fotoativados por 30s. As câmaras foram abertas e inoculadas com uma suspensão de 2,0 mL de células obtidas de cultura primária de polpa humana, e incubadas invertidamente por 48h. A citotoxicidade foi avaliada pela absorção de timidina radioativa (*[^{3}H]-thymidine*) pelas células. Réplicas do modelo experimental foram realizadas para análise química, por CLAE, da difusão de monômeros dos espécimes. Os resultados mostraram que não houve diferenças significantes na citotoxicidade entre os espécimes com ou sem MDPB. Quantidades altas de HEMA foram detectadas em

ambos materiais (1 mg ml^{-1}), consideradas doses tóxicas. Porém, o Bis-GMA, TEGDMA e UDMA não foram detectados. O MDPB foi detectado apenas nos espécimes preparados com altas concentrações (5%), mas em níveis não tóxicos para as células. Os autores concluíram que os compósitos que empregam *primers* autocondicionantes produziram efeitos citotóxicos em células pulpares e que a difusão do HEMA foi implicada neste efeito. A incorporação do MDPB (até 5%) nos primers não influenciou a citotoxicidade.

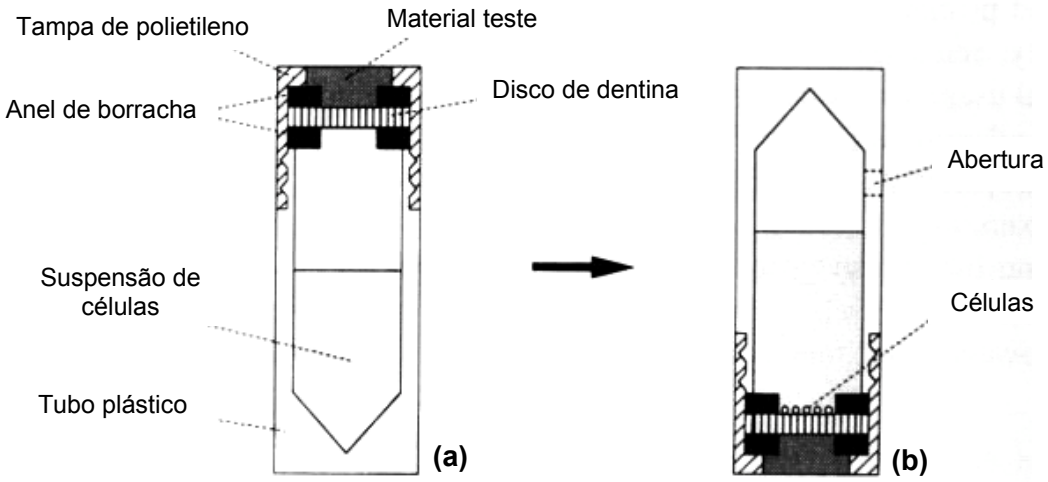


FIGURA 4 - Diagrama esquemático do teste de barreira dentinária. (a) – Disco de dentina fixado em tubo plástico e aplicação do primer e adesivo sobre o seu lado oclusal. (b) – Inoculação de uma suspensão de 3 x 10^4 células pulpares/mL e inversão do tubo para precipitação e colonização no lado pulpar da dentina.

Tay, Pashley[68] (2001) examinaram a agressividade de três sistemas adesivos autocondicionantes quanto a sua capacidade de penetrar a *smear layer* (SL) de diferentes espessuras e produzir autênticas camadas híbridas na subsuperfície intacta da dentina. Os sistemas Clearfil Mega Bond – CMB – pH 2,0 (Kuraray – Osaka, Japão), Non-Rinse Conditioner/Prime&Bond – NRC/PB – pH 1,2 (Dentsply, DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Prompt L-Pop – PP – pH 1,0 (ESPE – Seefeld, Alemanha) foram aplicados sobre discos de dentina de 1,0-1,5 mm de espessura com fina e espessa *smear layer* (produzidas com lixas de granulação 600 ou 60, respectivamente) e em dentina fraturada, sem *smear layer* (controle) conforme recomendações dos fabricantes. Os espécimes foram preparados e examinados em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Na ausência de *smear layer* os 3 sistemas desmineralizaram a dentina fraturada em diferentes profundidades (0,4 µm; 1,2-1,5 µm e 2,5 µm, respectivamente), em função do pH, refletindo diferentes graus de agressividade. O CMB se difundiu pela *smear layer*, independente de sua espessura e produziu uma autêntica camada híbrida de aproximadamente 0,5 µm. A *smear layer* e *smear plugs* ficaram retidas no complexo hibridizado. O NCR/PB dissolveu a *smear layer* e *smear plugs* de camadas finas, e somente a porção mais superficial das camadas mais espessas, retendo parte da porção basal desta estrutura dentro do complexo hibridizado, formando autênticas camadas híbridas de 2,0-2,5 µm. O PP foi o sistema mais agressivo, formando camadas híbridas de 3,5-4,0 µm, dissolvendo completamente a *smear layer*,

independente de sua espessura, próximo do padrão formado por adesivos que utilizam o condicionamento prévio da dentina com ácido forte. Os autores concluíram que os sistemas estudados possuem agressividades diferentes, possivelmente em função dos componentes ácidos utilizados.

Kaga et al.[40] (2001) examinaram a relação entre a quantidade de monômeros liberados de sistemas adesivos e sua citotoxicidade e o efeito destes monômeros na composição e fosforilação da tirosina intracelular, a qual está relacionada à atividade de crescimento das células L929 in vitro. Amostras de *primers* e adesivos fotoativados e sem fotoativação foram obtidos dos sistemas Scotchbond Multi-Purpose (3M, St. Paul, MN, EUA) e Clearfil Liner Bond 2 (Kuraray, Co., Osaka, Japão) e colocadas em contato com uma cultura de fibroblastos L929 por 24 h. Os materiais sem fotoativação foram pesados e armados em tubos de vidro (4mm de diâmetro x 1mm de altura), para ocupar o mesmo volume dos componentes polimerizados. Em seguida, esses foram fixados com cera a uma placa de vidro, e um filtro de papel (4mm de diâmetro) foi colocado com o objetivo de manter o monômero líquido no tubo. Os espécimes testes, nos tubos de vidro, polimerizados ou não, foram unidos à tampa da placa de cultura, colocando as amostras suspensas, em contato com o meio sobre as células. A citotoxicidade foi avaliada pela área de células afetadas pelos monômeros liberados dos materiais, após 24 h de incubação, medida por um analisador de imagem. A quantidade de

monômeros liberados foi quantificada por CLAE baseados em padrões do HEMA e TEGDMA. Análises bioquímicas das células foram realizadas após a estimulação por 24 h com 1, 2, 3 ou 4 mg/mL de HEMA ou TEGDMA, por comparação da composição protéica por eletroforese (SDS-PAGE) e a ocorrência de fosforilação da tirosina por Western Blot. Os resultados mostraram que o HEMA foi detectado em altos níveis nos *primers* do SBMP e LB2 e nos adesivos sem fotoativação, reduzindo drasticamente a sua concentração após sofrer fotoativação. O TEGDMA foi detectado nos adesivos de ambos materiais. Tanto os *primers* quanto as resinas adesivas sem fotoativação mostraram intensa citotoxicidade, sem diferenças entre eles. Porém, com a fotoativação por 20 s, o MP não foi citotóxico e o LB2 mostrou leve citotoxicidade. Não houve mudança na SDS-PAGE das células com 1,2,3 ou 4 mg/mL de HEMA ou TEGDMA, mas as altas concentrações do HEMA (4 mg/mL) afetaram a fosforilação da tirosina intracelular. Os autores ressaltaram a importância de uma fotoativação adequada para a redução de liberação de componentes no meio.

Schmalz et al.[62] (2002) estudaram o efeito citotóxico de agentes de união dentinária de diferentes valores de pH (All-Bond 2 – BISCO, Köln, Alemanha – pH 5,2; Prime & Bond NT – Dentsply, DeTrey, Konstanz, Alemanha – pH 1,6; Sintac Single Component – Vivadent, Schaan, Liechtenstein – pH 1,4; Sintac Classic - Vivadent, Schaan, Liechtenstein – pH 4,0 e Prompt-L-

Pop – ESPE, Seefeld, Alemanha – pH 1,0) aplicados em discos de dentina bovina montados em uma câmara pulpar in vitro. Uma cultura de células derivadas de polpa bovina foi obtida e colocada em contato com o lado pulpar do disco. Perfusão de 0,3 mL de meio/hora foi realizada em todas as câmaras durante 24 horas, até a aplicação dos materiais testes no lado oclusal dos discos. Condicionamento ácido por 15 s foi realizado antes da aplicação do All-Bond 2, Prime & Bond NT e Sintac Single Component. A citotoxicidade foi avaliada após 24 h de incubação a 37^0C pelo teste de MTT, em condições estáticas ou com perfusão de meio de cultura no compartimento pulpar das câmaras de 0,3 mL/h e 2 mL/h. Cada experimento foi realizado com 5 réplicas e o material de moldagem silicona A (Presidente regular – COLTENE AG, Altstätten, Suiça) foi utilizado como controle negativo representando 100% da viabilidade celular. No experimento estático e com perfusão de 0,3 mL/h apenas o Syntac Classic reduziu a viabilidade celular (79,6% e 73,3%, respectivamente) significativamente em relação ao controle. O Prompt L-Pop foi o material menos citotóxico, apresentando efeito estimulador para as células. Comparações das médias de sobrevivência celular com perfusão de 0,3 mL/h com aquelas de 2,0 mL/h revelaram diferenças significantes somente para o Syntac Classic e Prompt L-Pop. Ambos efeitos, o tóxico do primeiro material e o estimulador do segundo foram reduzidos com a perfusão de 2 mL/h, indicando que a mesma pode remover as substâncias relevantes do sistema de cultura. Os efeitos citotóxicos produzidos pelo

Syntac Classic foram atribuídos à presença de glutaraldeído em sua composição. Os autores concluíram que os adesivos dentinários de baixo pH não foram citotóxicos neste modelo de estudo, e que danos pulpares após utilização destes sistemas são improváveis de acontecer.

Vajrabhaya et al.[71] (2003) investigaram a citotoxicidade de sistemas adesivos que removem a *smear layer*, Syntac Single-Component (Vivadent, Schaan, Liechtenstein); Prime & Bond 2.1 (Dentsply DeTray, Konstanz, Alemanha) e Single Bond (3M, St. Paul, MN, EUA) comparados a um sistema que modifica esta camada, One Up Bond F (Tokuyama, Tóquio, Japão). Discos de dentina de 0,5 mm foram obtidos de terceiros molares humanos e posicionados em placas de cultura de 24 compartimentos contendo ágar. Células de rato da linhagem fibroblástica L929 foram semeadas no lado pulpar dos discos e mantidas a 37^0C em incubadora umidificada contendo 5% de CO_2, por 24 h para se obter uma monocamada. Após este período, os discos foram inseridos em câmaras de cultura de células (modelo da barreira dentinária) e seu lado oclusal recebeu aplicação dos sistemas adesivos, conforme recomendações dos fabricantes. No grupo controle, utilizou-se um algodão embebido em meio de cultura. A atividade enzimática das células foi avaliada pelo teste MTT após 24 h, e os resultados expressos como porcentagem do controle. O sistema adesivo One Up Bond F mostrou menor citotoxicidade (93,24% de viabilidade celular) que os demais sistemas, os quais não diferiram entre si. Os autores

atribuíram os resultados ao fato do sistema autocondicionante, por não remover a *smear layer*, permitir que uma concentração menor de substâncias tóxicas penetre através da dentina. Também, por não requerer condicionamento ácido prévio, não aumentar a permeabilidade dentinária. Além disso, os mesmos especularam sobre um possível efeito do componente fluoretado encontrado apenas neste sistema, como um dos fatores responsáveis pela baixa citotoxicidade.

Para obter informações sobre a ocorrência de sensibilidade com os metacrilatos, Henriks-Eckerman et al.[37] (2004) identificaram e determinaram suas concentrações em 7 sistemas adesivos, 8 resinas compostas e 2 cimentos ionoméricos. Amostras dos produtos comerciais foram pesadas e dissolvidas em acetona para quantificação (0,5 e 2,0 mg/mL) e identificação (2-10 mg/mL). A identificação foi realizada por CG/EM, comparando o espectro de massas dos metacrilatos com os disponíveis em bancos de dados. Os componentes (2-HEMA, EMA, EGDMA, TEGDMA, UEDMA, BisGMA, BisEMA, entre outros di e trimetacrilatos alifáticos) foram quantificados por cromatografia líquida (CL) com detecção ultravioleta, pelo método de padrão externo. As análises mostraram o 2-HEMA e o BisGMA como os metacrilatos mais freqüentes nos materiais adesivos, o BisGMA e TEGDMA mais freqüentes nas resinas compostas e o 2-HEMA e o TMPTMA (trimetacrilato trimetilolpropano) mais encontrados nos cimentos ionoméricos. Para os autores, os metacrilatos em concentrações

maiores que 1%, potenciais sensibilizadores (como o 2-HEMA, BisGMA, UEDMA e TEGDMA) e irritantes químicos, precisam ser claramente apresentados nas fichas técnicas dos materiais (MSDS-*Material Safety Data Sheet*) para reduzir os riscos à saúde das pessoas e diminuir a exposição a estes componentes.

Galler et al.[21] (2005) estudando a influência da dentina nas reações pulpares a diferentes substâncias, avaliaram os efeitos do Syntac Classic (Vivadent, Ellwangen, Alemanha), Prompt L-Pop (3M ESPE, Seefeld, Alemanha) e Vitrebond (3M ESPE, Borken, Alemanha) aplicados sobre a dentina, em culturas de células derivadas de papila dentária. Os discos de dentina, com espessura de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 mm foram montados em câmaras de perfusão configurando o teste da barreira dentinária, e receberam no seu lado pulpar uma cultura tridimensional de células pulpares. As câmaras foram mantidas sob perfusão de 0,3 mL/h de meio de cultura por 24h, quando então foram aplicados os materiais testes no lado oclusal dos discos. A citotoxicidade foi avaliada após 24 h pelo teste MTT, sendo que parte das câmaras foram mantidas estáticas e parte sob perfusão de 2 mL/h de meio de cultura durante esse período. O Syntac Classic reduziu a viabilidade celular para 17% independente da espessura dentinária e apresentou uma redução significantemente maior em condições de perfusão. A difusão do Vitrebond e do Prompt L-Pop foi significantemente influenciada pela espessura da barreira dentinária, e em média mantiveram a viabilidade celular em 23 a

53% (para discos de 100 e 500 µm) e 59 a 107% (para discos de 100 e 500 µm), respectivamente. Porém, não apresentaram diferenças nas condições estáticas ou sob perfusão. Os autores concluíram que as propriedades protetoras da dentina parecem ser seletivas e dependem da natureza química do material aplicado sobre este substrato. Neste estudo, houve redução da viabilidade celular para o adesivo com glutaraldeído, superior a do cimento ionômero de vidro fotoativado e não houve redução da viabilidade celular para o adesivo autocondicionante.

Para correlacionar a extensão e cinética da polimerização adesiva com sua permeabilidade, Cadenaro et al.[6] (2005) avaliaram 4 diferentes agentes de união à dentina, OptiBond FL (Sybron-Kerr, Orange, CA, EUA); One-Step (Bisco, Schaumburg, IL, EUA); Clearfil Protect Bond (Kuraray Medical, Tóquio, Japão) e Xeno III (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) pelo uso combinado do método DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) e de dureza. Filmes adesivos de 15 mg (n=10) foram preparados a partir de cada material e a porcentagem de polimerização, normalizada pelo peso da amostra, foi determinada após 20s, 40s e 60s de fotoativação (XL-2500, 3M ESPE). Estes dados foram correlacionados com as medidas de dureza Vickers (MV). A permeabilidade dos adesivos, sob as mesmas condições experimentais foram avaliadas em dentes humanos extraídos conectados a um dispositivo para leitura da permeabilidade e analisados estatisticamente. Os resultados mostraram que a

extensão de polimerização (EP) aumentou para todos os adesivos com o tempo de cura prolongado (40 e 60s). Somente o OptiBond FL não apresentou diferença entre 40 e 60s, e com a fotoativação por 20s os mais baixos valores de EP foram obtidos com o One-Step e Xeno III. Houve forte e significante correlação entre os valores de EP e MV para todos os adesivos em cada tempo de fotoativação. Todos os adesivos exibiram uma redução na permeabilidade com o aumento do tempo de polimerização. O Xeno III exibiu as mais altas permeabilidades em todos os tempos de cura e mostrou polimerização incompleta mesmo após 60s. Houve uma correlação inversa entre os valores de permeabilidade e EP. Os autores sugeriram o uso de tempos de fotoativação mais longos que os recomendados pelos fabricantes, para tentar melhorar o desempenho destes sistemas, com um maior grau de polimerização e redução da permeabilidade.

Çetinguç et al.[10] (2006) avaliaram e compararam a quantidade de HEMA difundido de 3 sistemas adesivos aplicados em molares decíduos jovens e velhos. Cavidades oclusais de 4 mm de diâmetro foram preparadas nas coroas dentárias, após o corte de suas raízes, seguida de sua montagem em câmaras de polipropileno contendo 1 mL de água destilada. A dentina destes dentes (1,0 mm de espessura remanescente) recebeu um dos seguintes tratamentos: ácido fosfórico 37% por 15s seguido da aplicação do sistema Syntac Single Component - Ivoclar Vivadent, Ellwangen, Alemanha (Grupo 1); Syntac Single Component – Ivoclar Vivadent,

Ellwangen, Alemanha, sem condicionamento prévio (Grupo 2) e Clearfil SE Bond – Kuraray Méd Inc., Tóquio, Japão (Grupo 3), todos seguidos de restaurações com cimento de ionômero de vidro (Ketac Molar – 3M ESPE, AG, Alemanha). Os eluatos obtidos nas câmaras foram coletados após 4 min, 24h e 72h e analisados por CLAE. O HEMA foi detectado nas amostras de todos os grupos e sua liberação foi significantemente diferente dependendo do sistema adesivo aplicado, em ambos, dentes jovens e velhos. Aproximadamente 50% da liberação do HEMA ocorreu nos primeiros 4 min, diminuindo com o tempo. A mais alta liberação de HEMA ocorreu com 4 min em dentes jovens tratados com condicionamento ácido e sistema Syntac Single Component, enquanto a mais baixa foi obtida em dentes decíduos velhos tratados somente com o Syntac Single Component. Nenhuma diferença foi encontrada entre o condicionamento ácido e o *primer* autocondicionante (Grupo 3) com 24 e 72 h em dentes decíduos jovens. Para os autores, a alta e rápida liberação do HEMA aos 4 min (183,5 e 482 vezes maior que 24 e 72 h, respectivamente) pode indicar que monômeros não polimerizados, totalmente livres, estavam presentes dentro dos túbulos dentinários mesmo após a polimerização da resina adesiva. Porém, como a mais alta quantidade de HEMA liberada neste estudo (485 nmol/mL, ou seja, 63 µg) está abaixo da concentração citotóxica (> 96,9 µg) os autores consideraram estes sistemas adesivos seguros para dentes decíduos jovens ou velhos com remanescente dentinário mínimo de 1,0 mm de espessura.

Kenshima et al.[41] (2006) estudaram o efeito condicionante, os tags de resina (TR) e a camada híbrida (CH) produzida por sistemas autocondicionantes de diferentes valores de pH, aplicados sobre *smear layer* (SL) fina ou espessa. Como controle foi utilizado um sistema convencional de 3 passos. Vinte e sete terceiros molares hígidos foram seccionados longitudinalmente (sentido buco-lingual) após remoção do terço oclusal de suas coroas, sendo que cada metade recebeu tratamento com lixa de granulação 600 ou 60 por 60s, para produção de uma *smear layer* fina e espessa, respectivamente. A *smear layer* produzida foi medida por um software analisador de imagens (UTHSCSA Image Tool, versão 2.0). Para avaliação dos TR e CH, os sistemas autocondicionantes Clearfil SE Bond - Kuraray Méd Inc. Tóquio, Japão (fraco – pH 2,0), Optibond Solo Plus Self-Etch Primer + Optibond Solo Plus – Kerr Orange, CA, EUA (intermediário – 1<pH<2) e Tyrian Self Priming Etching SPE + One-Step Plus – Bisco, Schaunburg, IL, EUA (forte – pH <1) foram aplicados na dentina, seguidos da aplicação de uma camada de resina composta (Filtek Z250, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). O sistema Scotchbond Multipurpose Plus (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi usado como controle. Os espécimes foram desmineralizados, desproteinizados e processados para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a avaliação do efeito condicionante, após a aplicação dos *primers*, os espécimes receberam protocolo de lavagens com acetona, água deionizada e álcool 96%, seguido do processamento

e análise em MEV. O Clearfil SE Bond removeu parcialmente a SL espessa com incompleta dissolução dos *smear plugs*, enquanto que o sistema com menor pH mostrou efeito condicionante semelhante ao convencional de 3 passos, independente da espessura da SL. Os TR variaram em densidade e forma com os 3 sistemas onde áreas de infiltração monomérica aparentemente incompleta foram identificadas em variadas extensões, dependendo da acidez do primer. Para o sistema mais ácido, maior foi a densidade de tags por unidade de área e menores áreas com formação incompleta de tags, enquanto o sistema mais fraco foi altamente influenciado pela espessura da SL, apresentando TR escassos e curtos. Os TR do sistema intermediário não foram influenciados pela espessura da SL. Porém, somente o sistema convencional mostrou um padrão regular e consistente de TR em toda a dentina, independente da SL. A CH não foi afetada pela espessura da SL, embora tenha apresentado clara distinção de espessura entre os sistemas autocondicionantes e convencional. Entre os autocondicionantes, não houve diferença na espessura entre o fraco e intermediário, mas o mais forte apresentou uma CH marcadamente mais espessa.

Com o objetivo de estudar o padrão de morte celular envolvido na resposta biológica a materiais dentários, Becher et al.[2] (2006) compararam extratos de 2 resinas compostas modificadas por poliácidos (Freedom – SDI, Austrália e F2000 – 3M, St. Paul, MN, EUA) com a dos monômeros TEGDMA, HEMA e GDMA,

na indução de necrose e apoptose in vitro. Os extratos foram obtidos mantendo-se amostras (5 mm de diâmetro e 5 mm de altura) dos materiais fotoativados em meio de cultura por 24h, e por diluições dos monômeros (10, 100, 400, 1000 e 2000 µg/mL para o TEGDMA e HEMA; e 50 e 100 µg/mL para o GDMA). Estes extratos foram colocados em contato com macrófagos alveolares de ratos e macrófagos da linhagem J774A1 por 8 ou 20 h, sendo a citotoxicidade avaliada pelo teste MTT, e a apoptose por microscopia fluorescente e citometria de fluxo. Os extratos e as soluções padrões dos monômeros foram analisadas quimicamente por CG/EM e mostraram a presença de metacrilatos nas soluções. O HEMA foi o componente encontrado em maior quantidade no Freedom e GDMA no F2000. Tanto os extratos dos compômeros como as diluições contendo os monômeros tiveram potencial de induzir morte celular nos macrófagos in vitro. Entretanto, as concentrações de HEMA e TEGDMA necessárias para induzir necrose e apoptose foram mais altas do que aquelas provenientes dos compômeros, indicando que a mistura de monômeros tem um potencial maior de indução de necrose e apoptose que os monômeros isolados. Este efeito foi dose-dependente, maior para o Freedom após 8h e semelhante entre os dois compômeros após 20h. O TEGDMA mostrou-se mais citotóxico que o HEMA, causando maior acúmulo de células apoptóticas. A citotoxicidade do GDMA pareceu ainda maior que os outros componentes, porém dependente do tipo celular e pode ter contribuído para a citotoxicidade do F2000. Apesar das implicações deste estudo não serem

conclusivas, os autores ressaltaram o papel do padrão de morte celular na avaliação da biocompatibilidade dos materiais dentários, uma vez que, a apoptose provoca uma resposta inflamatória menor nos tecidos que o processo de necrose.

Para testar a hipótese de que o antioxidante NAC (N-acetil-L-cisteína) pode proteger as células contra os efeitos citotóxicos do HEMA, Spagnuolo et al.[64] (2006) avaliaram a influência deste monômero nos níveis de espécies de oxigênio reativo (ROS), morte celular e atividade mitocondrial de fibroblastos gengivais humanos (FGH), na presença ou ausência de NAC. Culturas primárias de FGH foram obtidas e incubadas após 24h em várias concentrações de HEMA (0-12 mM), com ou sem NAC por 6h, 12h e 24h. A atividade da desidrogenase mitocondrial foi avaliada pelo teste MTT e a produção de ROS quantificada por uma sonda fluorescente e analisada por citometria de fluxo. As alterações morfológicas celulares foram observadas por microscopia de contraste de fase *(phase contrast microscopy)* e a morte celular por citometria de fluxo (% de células viáveis, apoptóticas e necróticas). Na ausência de NAC, após 24h de exposição às concentrações de 10 e 12 mM de HEMA, houve redução da atividade mitocondrial e da viabilidade celular e um aumento da população necrótica, estatisticamente significante. Somente as células expostas a 10 mM HEMA na presença de 5 mM NAC não apresentaram alterações morfológicas. O NAC foi ativo nas concentrações de 5 e 10 mM, na presença do HEMA, não

apresentando nenhum efeito na produção de ROS e na citotoxicidade quando utilizado sozinho. O HEMA induziu um aumento de ROS, o qual foi tempo e concentração dependente, com uma significante produção após 2h, mas menos pronunciada após 4 e 6h. Os autores concluíram que altas concentrações de NAC protegeram os FGH contra os efeitos citotóxicos do HEMA por reduzir os níveis de ROS induzidos por esse monômero e destacaram a importância de se investigar a relação entre os monômeros, os antioxidantes e os caminhos intracelulares modulados por ROS, tais como a sobrevivência e as quinases de estresse.

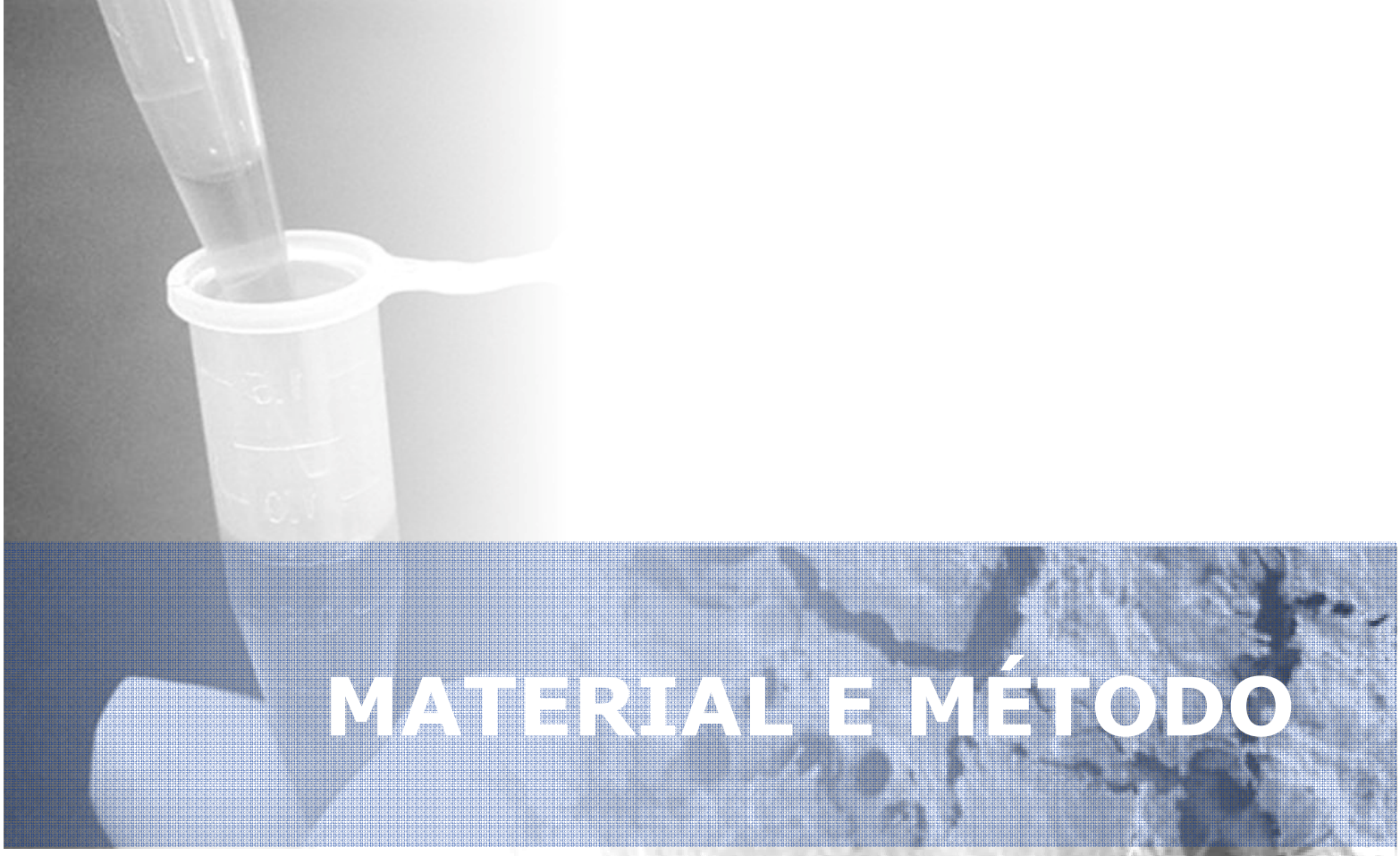
Samuelsen et al.[61] (2007) investigando os mecanismos envolvidos na resposta apoptótica após exposição ao HEMA e TEGDMA in vitro, verificaram o papel da formação de ROS, dos caminhos sinalizadores das quinases MAP (proteína ativada por mitógeno) e ativação de caspase. Cultura de células de glândula submandibular de rato foi obtida e incubada por 2, 4, 6, 8, 10 ou 16 h, sozinha (controle), ou com um dos monômeros resinosos HEMA (15 mM) e TEGDMA (4mM). O meio foi subseqüentemente trocado e as células novamente incubadas em meio sem os monômeros até o período total de 24 h. A fomação de ROS, com ou sem Vitamina C foi determinada pelo teste diclorofluoresceína (DCF) e a apoptose e necrose avaliada por microscopia de fluorescência. A análise das proteínas quinases MAP fosforiladas, ERK1/2 (associada com a proliferação e sobrevivência celular), p38 e

JNK (associadas com o estresse oxidativo e apoptose), assim como das caspases específicas foi realizada por Western blots. Os resultados mostraram um aumento na formação de ROS, concentração-dependente, após 1h de exposição aos monômeros, significante para todas as concentrações testadas; mais potente para o TEGDMA do que para o HEMA. Quando as células foram co-incubadas com Vitamina C, nenhum aumento significante de ROS foi observado. A resposta apoptótica foi detectada após 8-10 h de exposição. Para o HEMA, concentrações até 7,5 mM resultaram em aumento da porcentagem de apoptose; porém, em concentrações maiores houve aumento de necrose. Para o TEGDMA, houve aumento da porcentagem de apoptose e necrose em concentrações até 2 mM e de necrose em concentrações maiores. A Vitamina C reduziu a apoptose induzida pelo HEMA, mas não reduziu a do TEGDMA. A exposição aos monômeros aumentou a fosforilação do ERK e os níveis de caspase 9 p20. A fosforilação do JNk e p38 foi induzida apenas pelo HEMA. Os inibidores seletivos do ERK e JNK modificaram a resposta apoptótica após exposição a ambos monômeros, e do p38 somente após exposição ao HEMA. Os autores ressaltaram a importância da compreensão dos mecanismos de toxicidade destes materiais, destacando o envolvimento da formação de ROS e da ativação da cascata sinalizadora de quinase MAP neste processo.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propôs a avaliar a difusão transdentinária e a citotoxicidade de sistemas adesivos autocondicionantes com diferentes capacidades de dissolução da *smear layer* e desmineralização da dentina subjacente em cultura de células odontoblastóides.



MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Obtenção dos discos de dentina

Sessenta terceiros molares humanos hígidos (Figura 5A) foram obtidos por doação voluntária (entre 18 e 25 anos), após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP, Protocolo nº. 65/04) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Unesp (Anexos 1 e 2). Os dentes, após remoção dos restos orgânicos, foram armazenados em solução de timol 0,12%, 4°C, e utilizados dentro de um período máximo de 3 meses de sua obtenção.

De cada dente foi obtido um único disco de dentina, correspondente à região imediatamente acima dos cornos pulpares. Para isto, cada dente foi fixado em uma base de madeira com godiva (Figura 5B), e com auxílio de uma máquina para cortes ISOMET 1000 equipada com disco diamantado (BUEHLER, Lake Bluff, IL, EUA) e sempre refrigerado em água, um primeiro corte transversal foi realizado aproximadamente 2 mm acima da junção amelo-cementária no sentido oclusal (Figura 5C), removendo desta forma as raízes dentárias. Cortes seqüenciais foram realizados, se necessários, até se obter uma superfície plana em dentina sem a presença evidente de projeções dos cornos pulpares, inspecionada delicadamente, com auxílio de sonda exploradora (Figura 5D). Em seguida, um novo corte foi realizado a 0,5 mm de distância desta superfície (Figura 5E), resultando na obtenção de um disco de dentina com essa espessura (Figuras 5F e 5G).

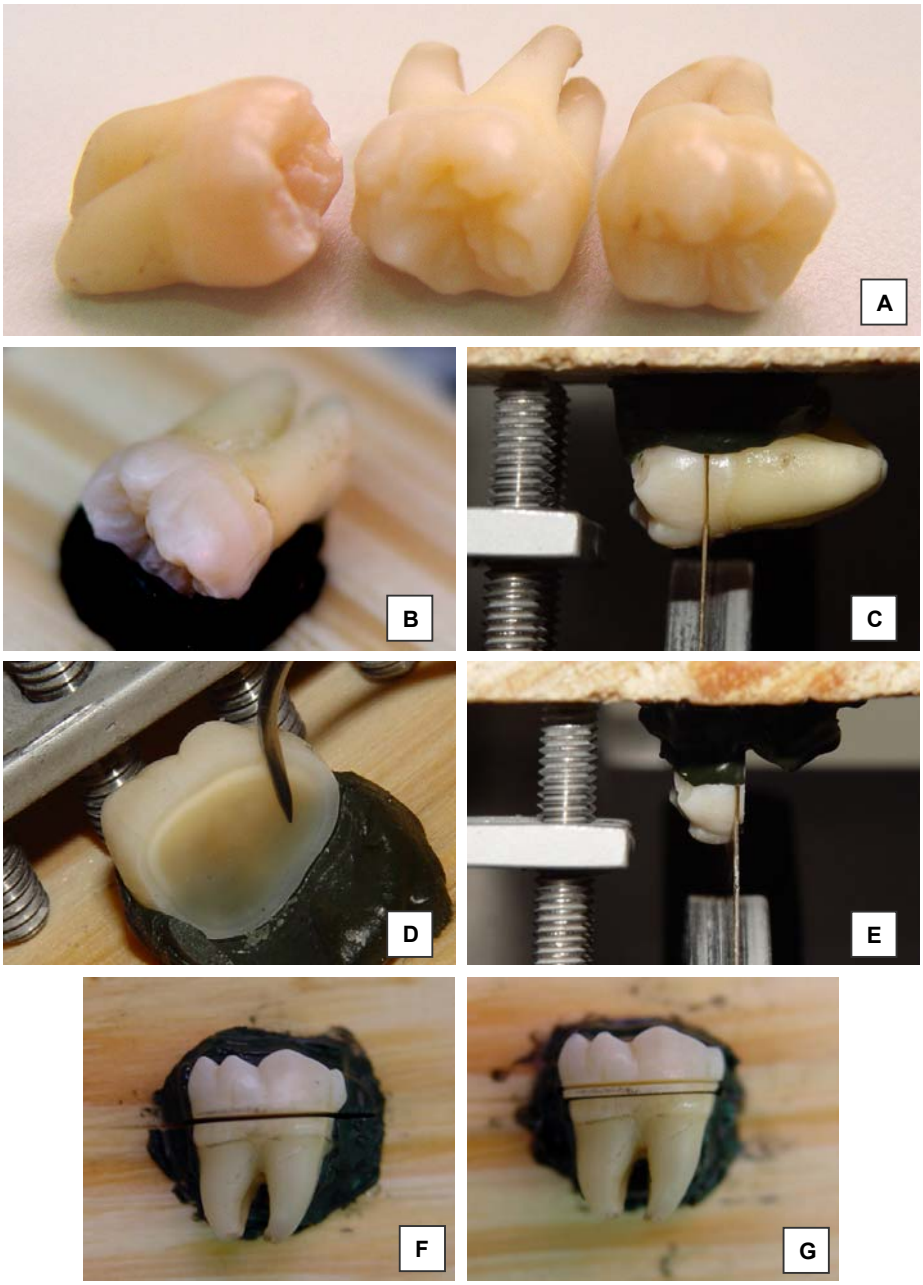


FIGURA 5 - Sequência laboratorial para obtenção dos discos de dentina. (A) 3os molares hígidos; (B) Molar preso com godiva para ser levado a Isomet; (C) Primeiro corte com o disco de diamante, paralelo e a 2 mm aquém da JAC; (D) Inspeção da presença de cornos pulpares; (E) Dente recebendo novo corte,agora para a obtenção do disco de dentina com 0,5mm de espessura; (F) Ilustração do primeiro corte; G-ilustração do segundo corte.

Os discos foram cuidadosamente inspecionados em microscópio estereoscópico (modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) para verificação da presença de esmalte no lado oclusal e defeitos resultantes das projeções dos cornos pulpares do lado pulpar. Em cada disco foi realizada uma marca para identificação do lado oclusal, a qual orientou sua posterior montagem nos dispositivos pulpares.

Em seguida, os discos foram manualmente desgastados na face oclusal, com lixa de carbeto de silício 320 umidecida com água destilada até a espessura final de 0,4 mm, determinada com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil)(Figura 6A).

Os discos de dentina (n=60) ficaram armazenados em tampão fosfato (PBS, pH 7.2)(Figura 6B) até a leitura de sua permeabilidade.

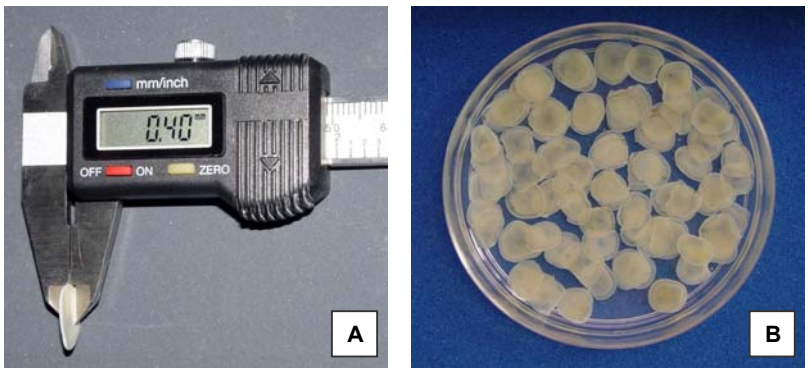


FIGURA 6 - (A) Avaliação da espessura final do disco de dentina com paquímetro digital; (B) Discos armazenados em solução tamponada (tampão fosfato, pH 7.2).

4.2 Determinação da permeabilidade dentinária (condutância hidráulica)

A determinação da permeabilidade dentinária foi realizada para permitir a distribuição homogênea dos discos de dentina nos grupos experimentais e controle, eliminando a influência desta variável na avaliação da difusão transdentinária e citotoxicidade dos sistemas adesivos, os quais serão aplicados sobre os mesmos. A forma mais simples para avaliar a permeabilidade dentinária é calcular sua condutância hidráulica (Lp) pela filtração[53]. A condutância hidráulica baseia-se na medição do volume de fluído forçado através do disco de dentina sob uma pressão hidrostática constante, por unidade de área, por unidade de tempo e por unidade de pressão, segundo a fórmula:

$$Lp = \frac{Jv}{A.\Delta P.t}$$

onde, **Lp** é a condutância hidráulica ($\mu L.cm^{-2}.min^{-1}.cm\ H_2O^{-1}$); **Jv** é o volume do fluido em µL; **A** é a área de superfície de dentina em cm^2; **ΔP** é o gradiente de pressão em cm H_2O; e **t** é o tempo em minutos.

Para a determinação da condutância hidráulica e subsequentes análises, os discos foram individualmente posicionados em dispositivos denominados câmara pulpar in vitro (*in vitro pulp chamber*, IVPC)(Figura 7) modificados a partir do dispositivo original desenvolvido por Hanks et al.[31]. Desta forma, a área de dentina disponível para a avaliação

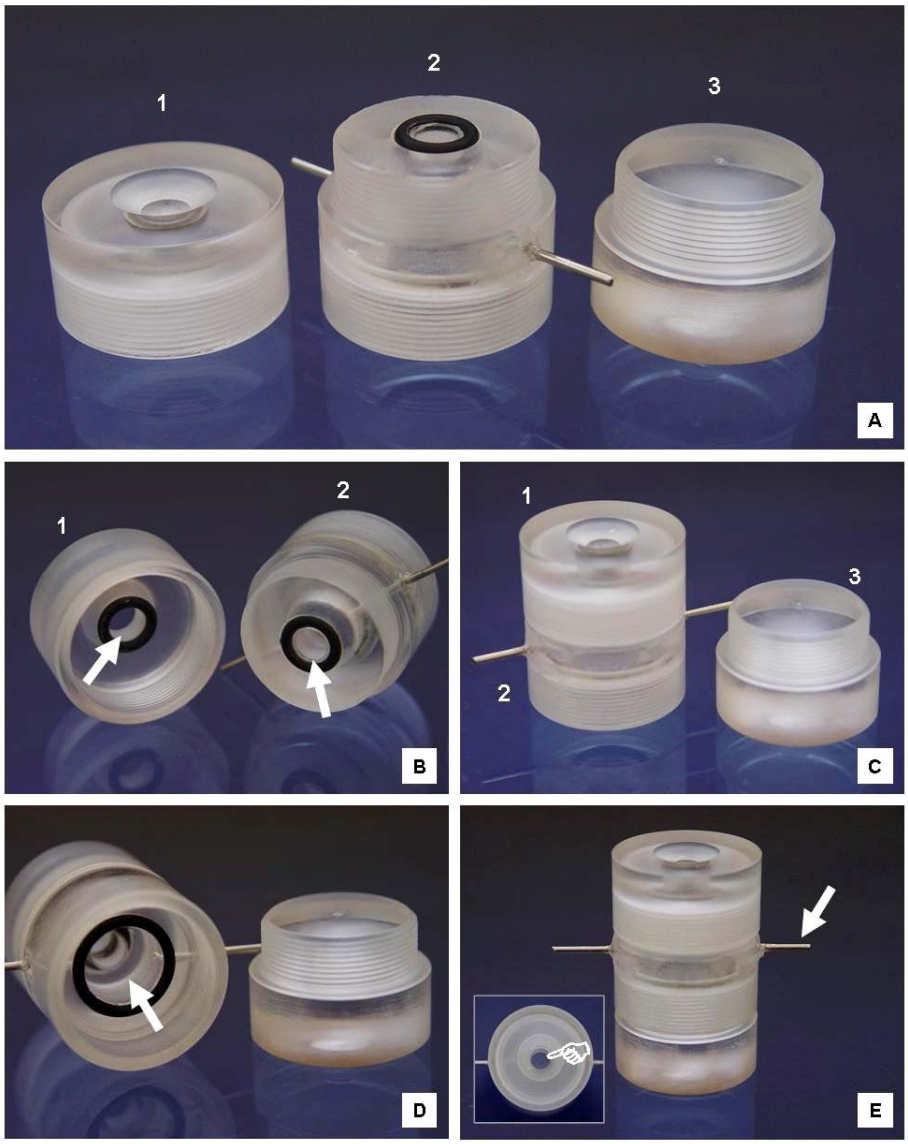


FIGURA 7 - Câmara pulpar in vitro modificada (*In vitro pulp chamber*). (A)Compartimentos constituintes da câmara (1=compartimento superior, 2=compartimento médio e 3=compartimento inferior); (B) Local de colocação do disco de dentina, entre os anéis de vedação dos compartimentos médio e superior (setas). Os anéis delimitam a área de dentina em 0,28 cm^2. (C) Compartimentos médio e superior acoplados por rosqueamento; (D) Detalhe da parte interna do compartimento médio, espaço para preenchimento com meio de cultura DMEM (volume = 1 mL) (seta). (E) Compartimento inferior acoplado aos demais por rosqueamento. Através das cânulas presentes no compartimento médio (seta) o dispositivo será conectado ao Flodec. Estas mesmas cânulas auxiliam na remoção de bolhas presentes quando do preenchimento do mesmo com meio de cultura. O *pointer* representa a área de dentina exposta quando a câmara é vista por cima.

da condutância hidráulica foi padronizada para todos os discos em 0,28 cm^2 (Figura 7B). Ambos os lados dos discos foram condicionados com solução EDTA (ácido etil diamino tetracético) 0,5 M pH 7.2, por 30 segundos, para remover a *smear layer* criada durante o desgaste, seguido de três lavagens abundantes com água deionizada.

Através da cânula presente no compartimento médio da câmara (Figura 7E), a mesma foi conectada por meio de um tubo de polietileno de 0,5 mm de diâmetro (sonda naso-gástrica n. 8) a um aparelho medidor de fluxo (Flodec, De Marco Engineering, Geneva, Switzerland) (Figura 8) capaz de detectar a movimentação, em micrometros, de uma pequena bolha de ar presente no interior deste tubo. Uma pressão hidrostática de 15 cm^2 de H_2O foi aplicada. A movimentação da bolha foi registrada (durante 5 minutos) através de um infra-vermelho e transformada em valor de condutância hidráulica por um software específico.

Determinada a condutância hidráulica, os discos individualmente identificados foram divididos (aleatorização em blocos) em 6 grupos (n=10) de tal forma que as médias e desvios-padrões desses grupos fossem, considerando-se este fator de confundimento, estatisticamente semelhantes (ANOVA, $p>0,05$) (Anexo 3).

Os discos foram então removidos das câmaras pulpares e congelados individualmente em solução tamponada (tampão fosfato, pH 7,2) até o momento de serem usados nos procedimentos de citotoxicidade.

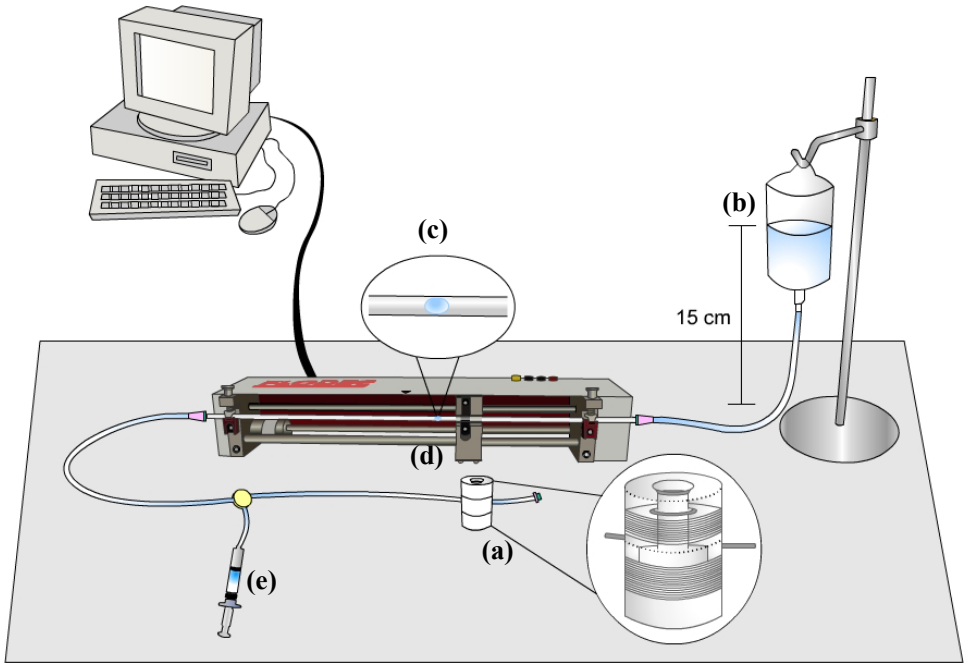


FIGURA 8 - Sistema Flodec utilizado para mensuração da condutância hidráulica ligado a software. (a) Câmara pulpar contendo o disco de dentina em seu interior, acoplado ao Flodec. (b) Coluna de água posicionada a 15 cm da superfície de dentina, acoplada ao aparelho, determinando o gradiente de pressão. (c) Bolha de ar incluída no interior do capilar de vidro, cuja movimentação é detectada através de infra-vermelho (d). (e) Seringa utilizada para inserir a bolha de ar no sistema.

4.3 Cultivo das células odontoblastóides sobre os discos de dentina

Células da linhagem MDPC-23 (*Mouse dental papilae cells*) foram cultivadas em garrafas plásticas com área de base de 75 cm^2 (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB,

Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 na temperatura de 37°C. Essas células foram subcultivadas a cada 3 dias (regime 3T6) até a obtenção de número de células suficiente para a realização do experimento. Todos os procedimentos envolvendo o cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar vertical (VECO DO BRASIL Ind. Com. de Equipam. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil).

Para a realização dos testes de citotoxicidade, os discos de dentina foram novamente montados nos dispositivos pulpares in vitro (Figuras 9A) e as cânulas laterais do compartimento médio fechadas para impedir vazamento do meio de cultura (Figura 9B). Depois de montados, a superfície dentinária oclusal de cada disco foi ligeiramente desgastada com uma broca carbide tronco-cônica (PM 35-KG Sorensen) em baixa rotação por 30 segundos para a formação da *smear layer* (Figura 9C). Em seguida, as câmaras pulpares com o disco de dentina em posição e embaladas individualmente foram esterilizadas através de gás de óxido de etileno[27,58](Central de Esterilização do Hospital Vera Cruz S.A., Belo Horizonte, MG, Brasil)(Figura 9D).

O experimento foi conduzido em quatro etapas (15 discos) sendo que representantes de todos os grupos foram incluídos em cada uma delas. Trinta mil células da linhagem MDPC-23 em meio de cultura DMEM completo foram plantadas sobre o lado pulpar dos discos de dentina, correspondente à área delimitada pelo anel de

borracha (Figuras 10A e 10B). As câmaras foram mantidas em posição invertida, fechadas pelo compartimento inferior (Figura 10C).

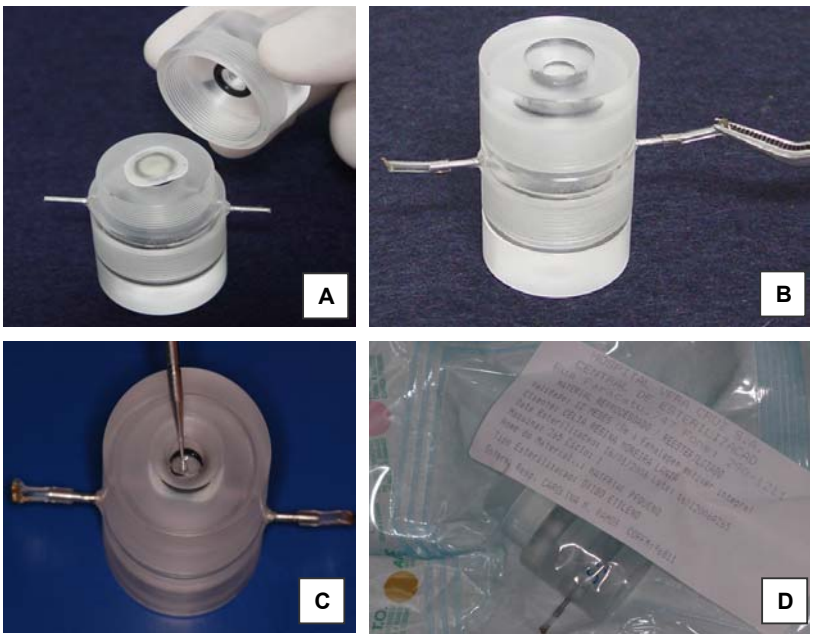


FIGURA 9 - Preparo das câmaras pulpares e discos de dentina para o experimento. (A) Posicionamento do disco entre os compartimentos médio e superior da câmara. (B) Fechamento da cânula no compartimento médio. (C) Produção de smear layer no lado oclusal do disco. (D) Esterilização hospitalar do conjunto montado, com gás óxido de etileno, e armazenagem em embalagem adequada.

Aguardado o período de 2 horas, necessário para adesão das células na superfície da dentina, o compartimento médio do dispositivo foi totalmente preenchido com o meio de cultura DMEM completo (volume de 1 mL) (Figura 10D).

As câmaras pulpares foram colocadas em recipiente de vidro com tampa, esterilizado (agrupadas 4 a 4), evitando-se exposição do conjunto e possível contaminação durante as etapas dos procedimentos (Figura 10E). O conjunto foi mantido em atmosfera umidecida de 5% de CO_2, na temperatura de 37°C (Figura 10F) durante todas as etapas do cultivo, sendo o meio de cultura trocado a cada 24 h. Após 48 horas de cultura, os sistemas adesivos foram aplicados sobre o lado oclusal dos discos.

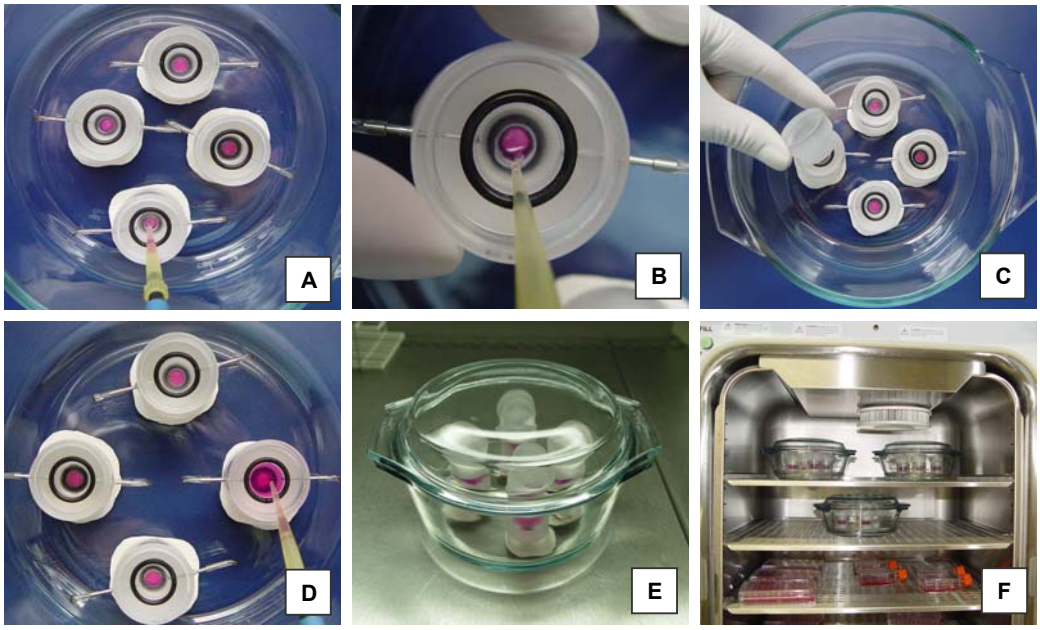


FIGURA 10 - Cultivo das células odontoblastóides no lado pulpar dos discos de dentina. (A) Câmaras posicionadas invertidamente, para o plantio das células (B) Detalhe do plantio celular na área delimitada pelo anel de vedação – 0,28cm^2. (C) Câmaras pulpares sendo fechadas pelo compartimento inferior do dispositivo. (D) Compartimento médio preenchido com DMEM completo, após 2 horas de incubação. (E) Câmaras posicionadas em recipiente de vidro com tampa para evitar contaminação durante o manuseio. (F) Manutenção dos espécimes em incubadora de CO_2 por 48h.

4.4 Aplicação dos sistemas adesivos

A classificação, principais componentes e protocolos de aplicação dos sistemas adesivos avaliados neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Antes da aplicação dos materiais teste, o meio de cultura das câmaras pulpares foi renovado e as câmaras foram fechadas e revertidas a sua posição normal. Também foi certificada a ausência de bolhas no seu compartimento médio, garantindo a presença do meio de cultura em contato com as células plantadas no lado pulpar (Figura 11A).

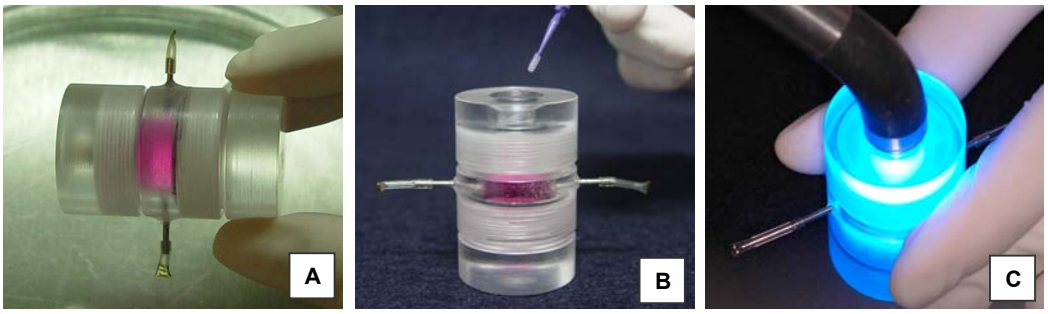


FIGURA 11 - Aplicação dos sistemas adesivos. (A) Observação da presença de bolhas no compartimento médio da câmara pulpar. (B) Aplicação do sistema adesivo. (C) Fotoativação.

Cinco microlitros de cada sistema adesivo foram pipetados, e então aplicados, segundo as recomendações dos respectivos fabricantes, sobre a superfície oclusal dos discos de dentina com auxílio de microbrush (Figura 11B) e fotoativados por 10s por meio de um aparelho de luz halógena,(Optilux 500, Kerr Company, Orange,EUA) (Figura 11C), previamente avaliado quanto

Tabela 1 - Componentes, pH, composição e protocolos de aplicação dos sistemas adesivos investigados

Sistema adesivo (classificação)	Componentes	pH	Composição	Protocolo de aplicação
Clearfil SE Bond (Primer autocondicionante)(Kuraray Medical Inc.)	Primer autocondicionante	1.9	HEMA, dimetacrilato hidrófilo, 10-MDP, N,N-dietanol *p*-toluidina, CQ, água	Aplicar primer, deixar passivamente por 20 s, aplicar adesivo, fotoativar por 10 s
	Adesivo	2.8	Sílica silanizada, BisGMA, HEMA, dimetacrilato hidrófilo, 10-MDP, toluidina, CQ	
Clearfil Protect Bond (Primer autocondicionante) (Kuraray Medical Inc.)	Primer autocondicionante	1.9	HEMA, dimetacrilato hidrófilo, 10-MDP, MDPB, N,N-dietanol *p*-toluidina, CQ, água	Aplicar primer, deixar passivamente por 20 s, aplicar adesivo, fotoativar por 10 s
	Adesivo	2.8	Sílica silanizada, BisGMA, HEMA, dimetacrilato hidrófilo, 10-MDP, toluidina, CQ, MDPB, fluoreto de sódio	
Adper Prompt (Autocondicionante simplificado) (3M ESPE)	Blister A Blister B	0.8 (misturado)	Mono e di-hema fosfatos, dimetacrilato, CQ, amina aromática substituída,fenol substituído Água, hidroximetilmetacrilato, ac poli-carbônico de metacrilato e fenol substituído.	Misturar blisters A e B, esfregar por 15 s repetir até superfície brilhante ser obtida. Fotoativar por 10 s
Xeno III (Autocondicionante simplificado) (Dentisply)	Líquido A Líquido B	1.0 (misturado)	HEMA, água, etanol, 2,6-di-tetrabutil-*p* hidroxi tolueno, nanopartículas Piro-EMA-SK, PEM-F, UDMA, BHT, CQ, EPD, *p*-dimetil amina etil benzoato	Misturar líquidos A e B, aplicar e deixar passivamente por 20 s, afinar com ar e fotoativar por 10 s
Single Bond (Convencional simplificado) (3M ESPE)	Frasco único	4.3	Bisphenol A diglicidil eter dimetacrilato, HEMA, dietacrilato, etanol, água	Após condicionamento da dentina com ácido fosfórico, aplicar 2 camadas do adesivo, afinar com ar e fotoativar por 10 s

BHT: 2,6-di-tert-butil-*p*-cresol; BisGMA: (1-metiletilideno)bis[4,1-fenilleneoxi(2-hidroxi-3,1-propanedil)]bismetacrilato; BPMD: bifenil dimetacrilato; CQ: canforoquinona; MDP: 10-metacriloiloxi metacrilato; MDPB: 12-metacriloiloxidodecilpiridinium brometo; HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; PEM-F: Pentametacril-oxi-etil-ciclo-fosfazen-monofluoreto; Pyro-EMA-SK:tetra-metacril-etil-pirofosfato; UDMA:uretano dimetacrilato

à intensidade de luz emitida com um radiômetro (média 450 mW/cm^2). Para os sistemas autocondicionantes de 2 passos Clearfil SE Bond e Protect Bond, 2,5 µL de cada componente, primer e adesivo, foram aplicados consecutivamente. Para os sistemas de passo único, Xeno III e Adper Prompt, os componentes foram misturados antes da aplicação e então aplicados os 5 µL .

O grupo controle negativo (n=10) foi representado pela aplicação de 5 µL de tampão fosfato sobre a superfície dentinária, seguida da aplicação da luz do fotoativador pelo mesmo tempo de 10s, enquanto que o controle positivo (n=10) foi representado pela aplicação do mesmo volume do sistema Single Bond, segundo protocolo descrito na tabela 1.

Todos os procedimentos adesivos foram realizados em capela de fluxo laminar vertical para evitar contaminação microbiana e imediatamente após, as câmaras pulpares foram novamente armazenadas em estufa de CO_2 por mais 24 horas.

Nas duas primeiras horas as câmaras pulpares foram mantidas em posição normal e fechadas para facilitar a difusão dos componentes pela dentina. Após este período as mesmas foram novamente invertidas, permanecendo abertas para a entrada de oxigênio e manutenção das condições ideais do cultivo.

4.5 Avaliação do metabolismo celular

O metabolismo celular foi avaliado através da análise da atividade mitocondrial pela técnica do metiltetrazolium (MTT), a qual detecta a presença da enzima desidrogenase succínica (SDH).

Oito dos dez discos inicialmente preparados para cada grupo experimental e controle foram utilizados para esta análise, 24 h após a aplicação dos materiais estudados.

O meio de cultura em contato com as células (compartimento médio da câmara pulpar), contendo os produtos da difusão dos adesivos pela dentina foi coletado e congelado para posterior análise em cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM) (Figura 12A). Feito isto, em cada câmara pulpar foram adicionados 900 µL de DMEM e 100 µL de solução MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-(brometo difeniltetrazolium) (Sigma, Chemical Companh, St. Louis, MO, EUA)], numa concentração de 5 mg do sal/mL (Figura 12B). As células foram incubadas por 4 horas a 37° C em 5% CO_2 e 95% ar, possibilitando a formação de cristais violáceos produzidos na presença de mitocôndrias ativas (Figura 12C e 12D).

Finalmente, 400 µL de solução de ácido isopropanol (100 µL de 0,04 N HCl em isopropanol) foram aplicados sobre os discos para dissolver estes cristais (Figura 12E). Decorrido o período de 1 hora, alíquotas de 100 µL (n=3) (Figura 12F) foram transferidas para uma placa de 96 wells (COSTAR 3595 - Corning Incorporated, NY, USA) (Figura 12G) e a coloração azul violácea produzida no meio foi quantificada por meio de leitor universal de Elisa (ElX 800, Bio-Tek instrumens Inc., Winooski, VE, EUA), equipado com filtro de comprimento de onda de 570 nm (Figura 12H).

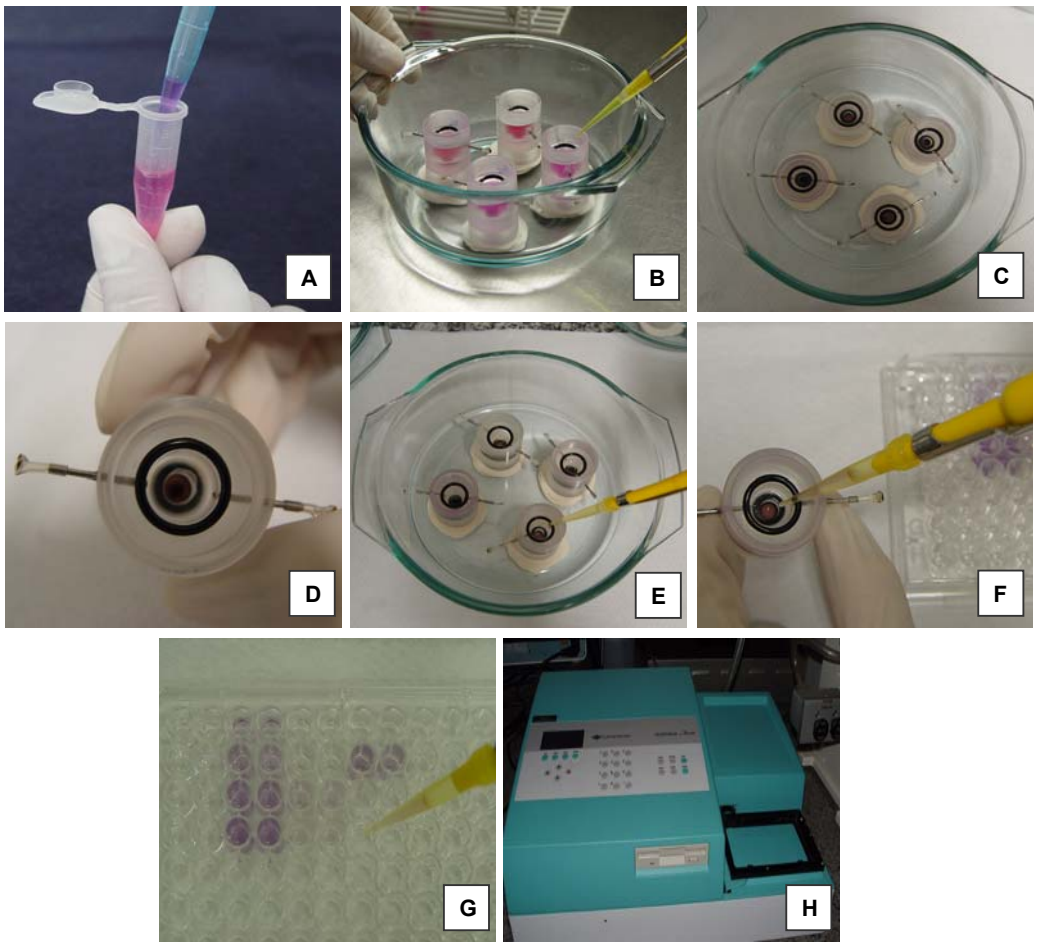


FIGURA 12 - Teste de MTT. (A) Coleta do meio para posterior análise química. (B) Colocação de meio de cultura contendo o sal do MTT sobre a monocamada de células no lado pulpar dos discos. (C) Formação de cristais da enzima SDH dando a coloração violácea obtida após 4h de incubação.(D) Detalhe desta coloração em um disco do grupo controle negativo. (E) Colocação do isopropanol acidificado para dissolução dos critais. (F) Coleta de alíquotas de 100 µL da solução em placa de 96 Wells (G), para quantificação em leitor de Elisa (H).

4.6 Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Duas análises foram realizadas em microscopia eletrônica de varredura: morfologia celular e morfologia da interação sistemas adesivos-dentina.

Para a análise da morfologia celular, os dois discos de dentina restantes para cada grupo experimental e controle foram utilizados. Decorridas 24 horas da aplicação dos sistemas adesivos, o meio de cultura foi removido e congelado, e as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (1 hora em temperatura ambiente e mais 2 horas sob refrigeração a 4^0C). Em seguida, foram delicadamente lavadas em PBS por 15 min e pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio 1% (OsO_4). Foi realizada nova lavagem com PBS e as células foram desidratadas em soluções crescentes de etanol em água (30, 50, 70, 95 e 100%) com trocas a cada 30 minutos, sendo que as duas últimas concentrações foram repetidas por 2 vezes. Os espécimes foram então secos em 1,1,1,3,3,3 – Hexametyldisilazane 98% (HMDS, ACROS Organics, New Jersey, NY, USA) com 3 aplicações de 20 minutos. Após serem mantidos por 24 horas em dessecadora, os espécimes foram montados em *stubs* metálicos e cobertos com ouro para análise em microscópio eletrônico de varredura (DSM 940, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Para a análise da interação sistemas adesivos-dentina, os discos utilizados para a avaliação do metabolismo celular foram recuperados e fraturados paralelamente ao longo eixo dos túbulos dentinários. Cada metade do disco obtida foi fixada em uma base confeccionada em resina composta fotoativada, de maneira a expor

a interface adesiva. Os espécimes assim preparados foram colocados em cuba de ultrasom (ULTRAsonic 1440 plus, ODONTOBRÁS IND. e COM. EQUIP. MED ODONT. LTDA, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) com água deionizada por 10 minutos, com o objetivo de remover possíveis resíduos acumulados ou retidos na interface durante a fratura. Os mesmos processos de desidratação descritos anteriormente foram repetidos para estes espécimes. Ao final, os discos foram mergulhados em HMDS por 60 minutos, colocados em dessecadora *overnight* e fixados em *stubs* metálicos para metalização em ouro. O perfil da interface adesiva foi avaliado em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Inglaterra).

4.7 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM)

O meio de cultura coletado imediatamente antes da análise do metabolismo celular e congelado foi analisado por meio de CG/EM para a identificação de possíveis componentes dos sistemas adesivos os quais se difundiram através da dentina e alcançaram o meio de cultura presente no compartimento médio da câmara pulpar.

As análises foram efetuadas utilizando-se um cromatógrafo à gás (Shimatzu GC 17 A, Tóquio, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu modelo QP-5050 A, Tóquio, Japão). Para essas análises foi utilizada uma coluna capilar SPB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e hélio como gás de arraste

(fluxo de 1 mL/min). As temperaturas utilizadas no injetor e no detector foram, respectivamente, de 250°C e 280°C.

Utilizou-se uma rampa de aquecimento com uma temperatura inicial de 45^0C (mantida durante 5 minutos), seguida de um aquecimento (à razão de 12^0C/min) até 220^0 C, permanecendo nesta temperatura final durante quinze minutos.

A identificação dos componentes monoméricos foi realizada pela análise dos tempos de retenção e comparação dos espectros de massas obtidos com os padrões autênticos injetados nas mesmas condições.

Com o objetivo de obter os cromatogramas padrões dos sistemas adesivos estudados, alíquotas destes sistemas foram retiradas diretamente dos seus frascos e diluídas em metanol para serem analisadas por CG/EM. Para os sistemas de dois passos (Clearfil SE Bond e Protect Bond) foram injetadas alíquotas do primer e do adesivo separados e primer-adesivo juntos. Para o sistema de passo único, mas com apresentação comercial em 2 frascos, Xeno III, foram injetadas alíquotas de cada frasco separado (Líquido A e Líquido B) e juntos. Para os sistemas Adper Prompt e Single Bond foram injetadas alíquotas únicas. Soluções padrões do HEMA, TEGDMA, fotoiniciadores (canforquinona e DMPT) também foram analisadas isoladamente, nas mesmas condições (Anexo 4).

4.8 Tratamento estatístico dos dados

Aos dados numéricos representativos da produção da enzima desidrogenase succínica (SDH), obtidos pelo método de MTT, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskall-Wallis, complementado pela análise de Mann-Whitney para a comparação múltipla aos pares. A redução do metabolismo celular foi computada a partir dos valores registrados para o grupo controle, representativo de 100% de viabilidade celular. Condutância hidráulica e citotoxicidade foram correlacionadas pela aplicação do teste de correlação de Spearman. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%.

RESULTADO

5 RESULTADO

Dados descritivos relativos à condutância hidráulica e produção da enzima SDH segundo os grupos são apresentados na Tabela 2. Ausência de correlação (r=0,12, p>0,05) entre essas variáveis foi observada. Todos os sistemas adesivos reduziram significantemente o metabolismo celular quando comparados ao grupo controle negativo, tampão fosfato (Tabela 2). Os sistemas Adper Prompt e Clearfil Protect Bond foram os materiais menos citotóxicos, sem diferença estatística entre eles (p>0,05), os quais foram seguidos pelo Xeno III e Clearfil SE Bond. O sistema convencional simplificado Single Bond (controle positivo), foi considerado o mais agressivo às células MDPC-23, uma vez que resultou na maior redução do metabolismo celular, 53,1%.

Tabela 2 - Mediana (amplitude) dos valores de condutância hidráulica e atividade da enzima desidrogenase succínica (SDH) segundo os grupos

Grupo	N	Condutância hidráulica ($\mu L.cm^{-2}.min^{-1}.cm\ H_2O_2^{-1}$)	Metabolismo celular (atividade SDH)	
Clearfil SE Bond	8	1,36 (0,48-3,90) A	0,119 (0,086-0,162)	a
Clearfil Protect Bond	8	1,34 (0,59-3,66) A	0,132 (0,110-0,165)	ab
Adper Prompt L-Pop	8	1,38 (0,49-3,56) A	0,162 (0,102-0,230)	b
Xeno III	8	1,39 (0,60-3,42) A	0,122 (0,109-0,141)	a
Adper Single Bond	8	1,30 (0,64-2,93) A	0,107 (0,083-0,130)	c
Tampão Fosfato (controle)	8	1,30 (0,59-2,80) A	0,228 (0,158-0,339)	d

[A] medianas seguidas pela mesma letra maiúscula para a condutância hidráulica e letra minúscula para atividade da SDH (absorbância) representam grupos que não diferem estatisticamente (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, p>0,05)

Em ordem decrescente de redução da produção da enzima desidrogenase succínica (SDH) os materiais podem ser apresentados na seguinte sequência: Single Bond (53,1%), Clearfil SE Bond (47,8%), Xeno III (46,5%), Clearfil Protect Bond (42,1%) e Adper Prompt (28,0%). Graficamente, a redução do metabolismo celular para cada grupo em relação ao controle (TF=100%) pode ser visualizada na Figura 13.

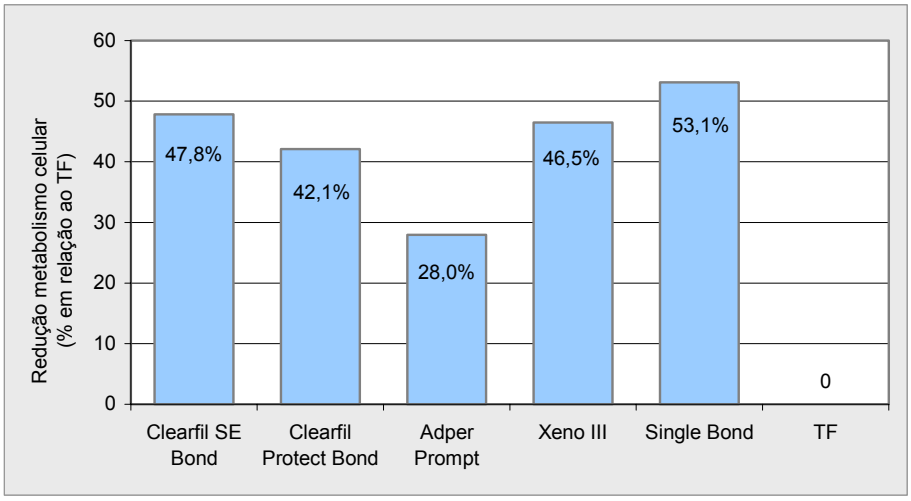


FIGURA 13 – Redução do metabolismo celular em relação ao controle negativo (Tampão fosfato = 100% de viabilidade).

Morfologia típica das células odontoblastóides MDPC-23, as quais estão organizadas em monocamada, pode ser observada nas fotomicrografias do grupo controle negativo (TF) (Figura 14). As células apresentam forma irregular pouco elevada e com amplo citoplasma, recobrindo a superfície de dentina quase que

completamente; poucos túbulos dentinários podem ser observados, sugerindo que as células encontram-se em confluência (Figura 14A). Também puderam ser observados numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos, originados da membrana celular, os quais são responsáveis pela adesão das células ao substrato dentinário sobre o qual estas células foram semeadas. Estruturas globulares sugerindo células em mitose também foram observadas sobre as células aderidas à superfície dentinária (Figura 14B).

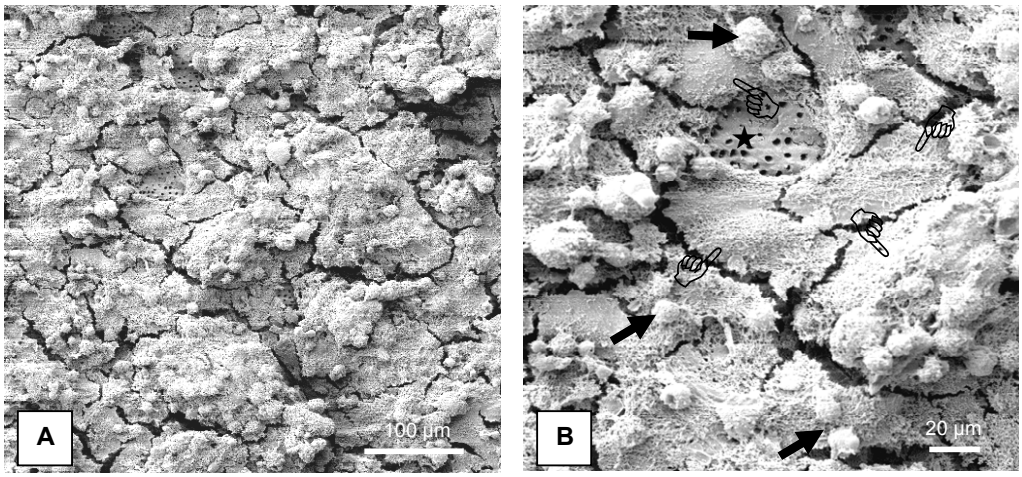


FIGURA 14 - Fotomicrografias em MEV representativas do grupo controle negativo (TF). (A) Aspecto morfológico normal das células MDPC-23 em confluência, cobrindo toda a superfície do disco de dentina. As células apresentam aspecto irregular e com amplo citoplasma. 200x (B) Maior aumento da Figura 14A detalhando a morfologia celular (☝) e pequenas áreas de exposição do substrato dentinário (★). Presença de estruturas globulares sugestivas de células em mitose sobre os odontoblastóides aderidos à dentina (setas). 500x

A análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura demonstrou, para os sistemas Single Bond (Figura 15) e Clearfil SE Bond (Figura 16), severo efeito citotóxico

sobre as células odontoblastóides. Para estes grupos, foi observada intensa morte celular direta, a qual foi caracterizada pela perda da maioria das células, expondo grandes áreas de dentina. As poucas células que permaneceram aderidas exibiam morfologia arredondada e com prolongamentos celulares curtos originados de sua membrana. Para o sistema Clearfil SE Bond, pode ser identificado o agrupamento celular na forma de *clusters* (Figura 16A).

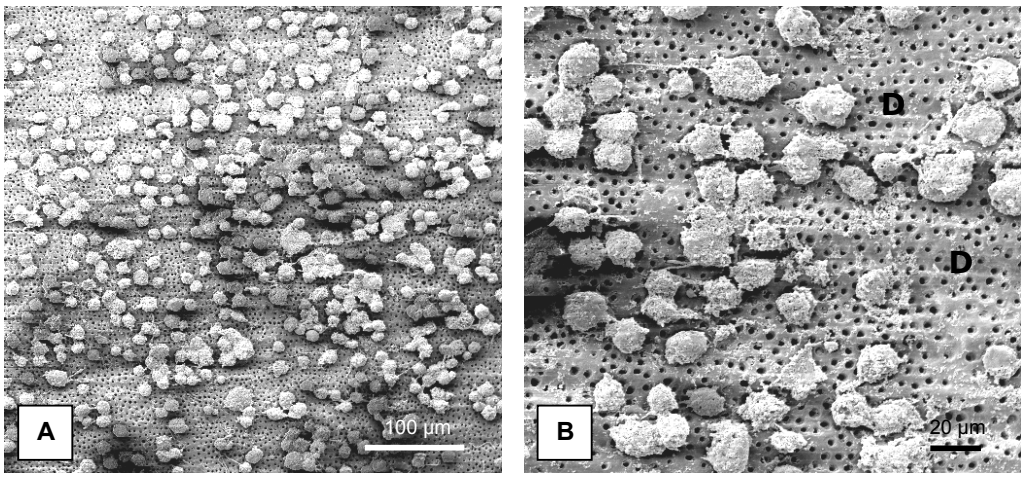


FIGURA 15 - Fotomicrografias em MEV representativas do grupo controle positivo (Single Bond). (A) Células MDPC-23 com morfologia arredondada e dispersas sobre o substrato dentinário. 200x (B) Detalhe da Figura 15A, onde pode ser observada ampla área de dentina tubular exposta (D) devido ao deslocamento das células. 500x.

Para o sistema Adper Prompt L-Pop (Figura 17), a maioria das células que permaneceram aderidas exibia forma arredondada, enquanto algumas ainda mantinham citoplasma irregular e relativamente amplo (Figura 17B). Também foi observado o agrupamento celular em *clusters*.

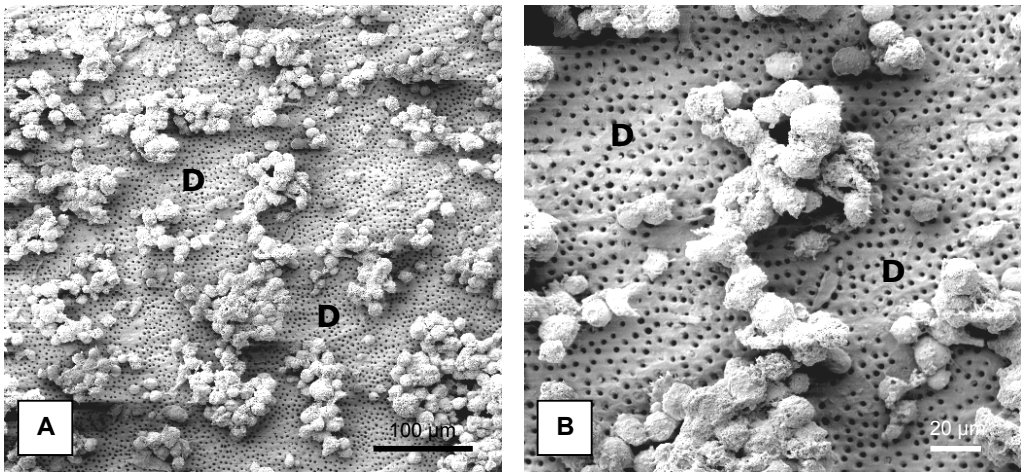


FIGURA 16 - Fotomicrografias em MEV representativas do grupo Clearfil SE Bond. (A) Células MDPC-23 com morfologia arredondada sobre o substrato dentinário agrupadas em *clusters* (D). 200x (B) Detalhe da Figura 16A, onde pode ser observada ampla área de dentina tubular exposta (D). 500x.

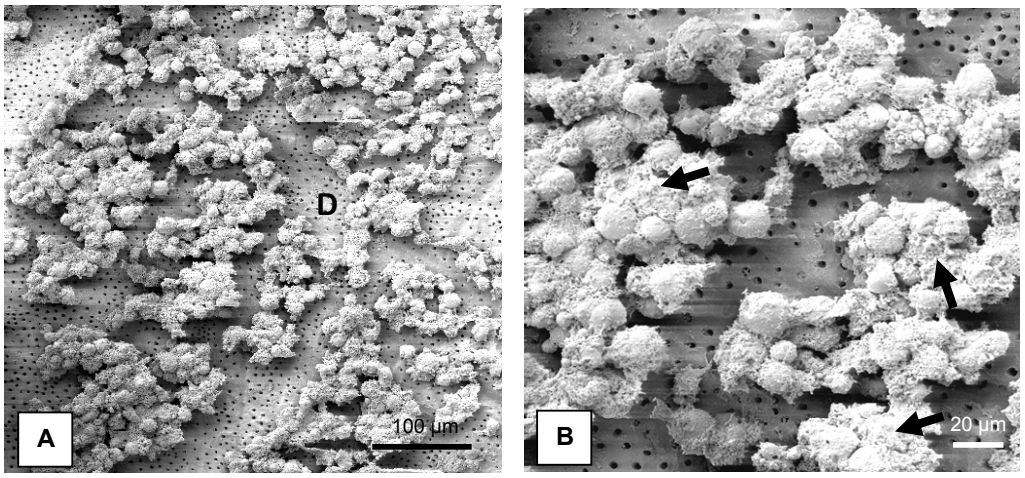


FIGURA 17 - Fotomicrografias em MEV representativas do grupo Adper Prompt L-Pop. (A) Numerosas células MDPC-23 com morfologia arredondada sobre o substrato dentinário (D). 200x (B) Detalhe da Figura 17A, onde podem ser observadas entre as células com morfologia arredondada, poucas células com citoplasma relativamente amplo (setas). 500x

Para o sistema Clearfil Protect Bond (Figura 18), as características morfológicas das células que permaneceram

aderidas ao substrato dentinário foram semelhantes àquelas descritas para o sistema Adper Prompt (Figura 17), porém em menor número.

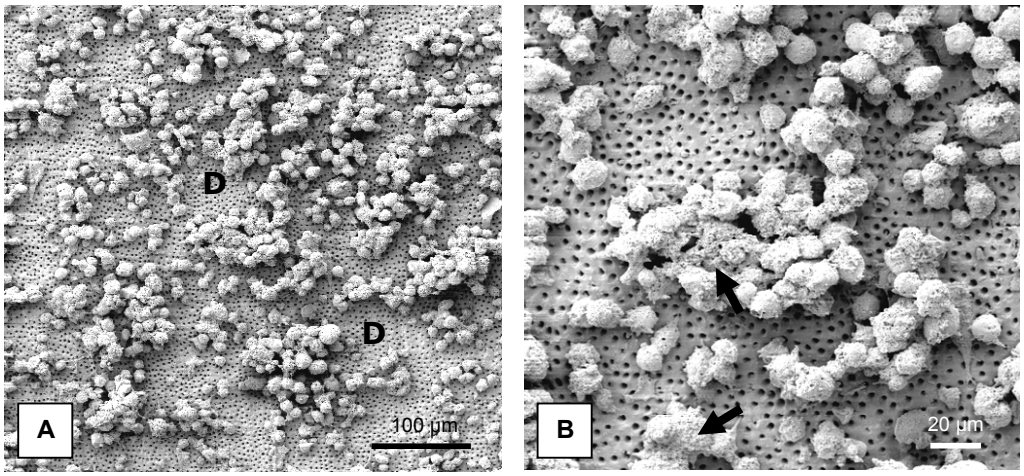


FIGURA 18 - Fotomicrografias em MEV representativas do grupo Clearfil Protect Bond. (A) Células MDPC-23 com morfologia arredondada permaneceram aderidas sobre o substrato dentinário (D). 200x (B) Maior aumento da região central da Figura 18A, onde podem ser observadas poucas células com citoplasma relativamente preservado (setas). 500x

A maioria das células em contato com componentes difundidos do sistema Xeno III (Figura 19) foram perdidas, sendo que as que permaneceram aderidas exibiam alterações morfológicas significantes. Algumas células preservaram citoplasma amplo com finos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana (Figura 19B).

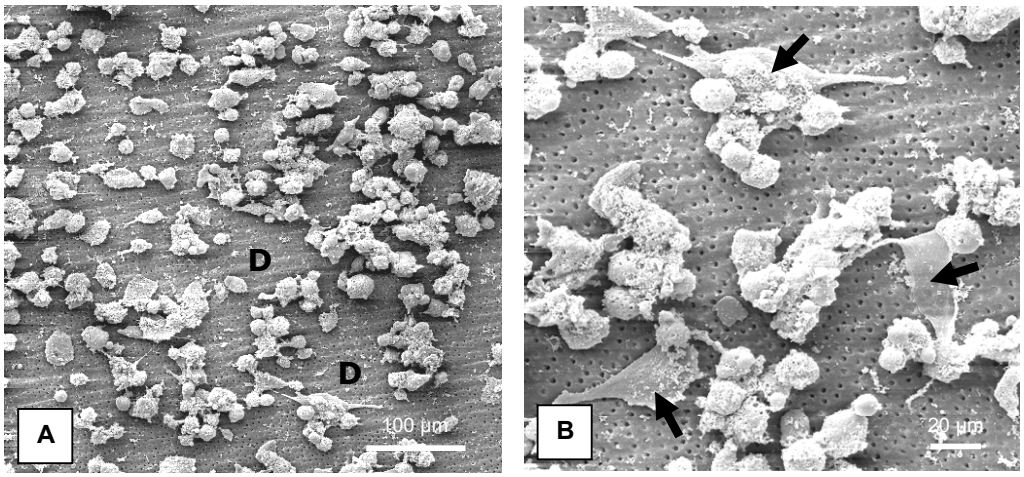


FIGURA 19 - Fotomicrografias em MEV representativas do grupo Xeno III. (A) Células odontoblastóides com morfologia arredondada em reduzido número aderidas ao substrato dentinário (D). 200x (B) Detalhe da Figura 19A, destacando-se algumas células com citoplasma recobrindo alguns túbulos dentinários e exibindo finos prolongamentos originados de sua membrana (setas). 500x

A análise via CG/EM dos materiais adesivos e da difusão está ilustrada nas Figuras 20 a 24 para os sistemas adesivos Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond, Adper Prompt L-Pop, Xeno III e Single Bond, respectivamente. Os cromatogramas padrões de amostras diretas dos sistemas adesivos investigados, ilustram a complexa composição de cada sistema (Figuras 20A, 21A, 22A, 23A e 24A). Porém, somente a substância HEMA, com tempo de retenção médio de 10,23 minutos, foi precisamente identificada em todos os eluatos, indicando ser este o principal componente difundido pela dentina, para todos os sistemas adesivos (Figuras 20B, 21B, 22B, 23B e 24B). Essa substância não foi detectada apenas no grupo controle negativo (TF).

A identificação do HEMA nos eluatos foi realizada por comparação de seu cromatograma, tempo de retenção e espectro de massas com o padrão autêntico do HEMA (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) (Anexo 4.1), injetado nas mesmas condições e monitorado na faixa de 40 a 550 g (”full scan mode”).

Outros componentes monoméricos como o TEGDMA e carforquinona não foram identificados em nenhum dos eluatos, refletindo ausência de difusão transdentinária, ou difusão em quantidades não passíveis de detecção pelo protocolo utilizado.

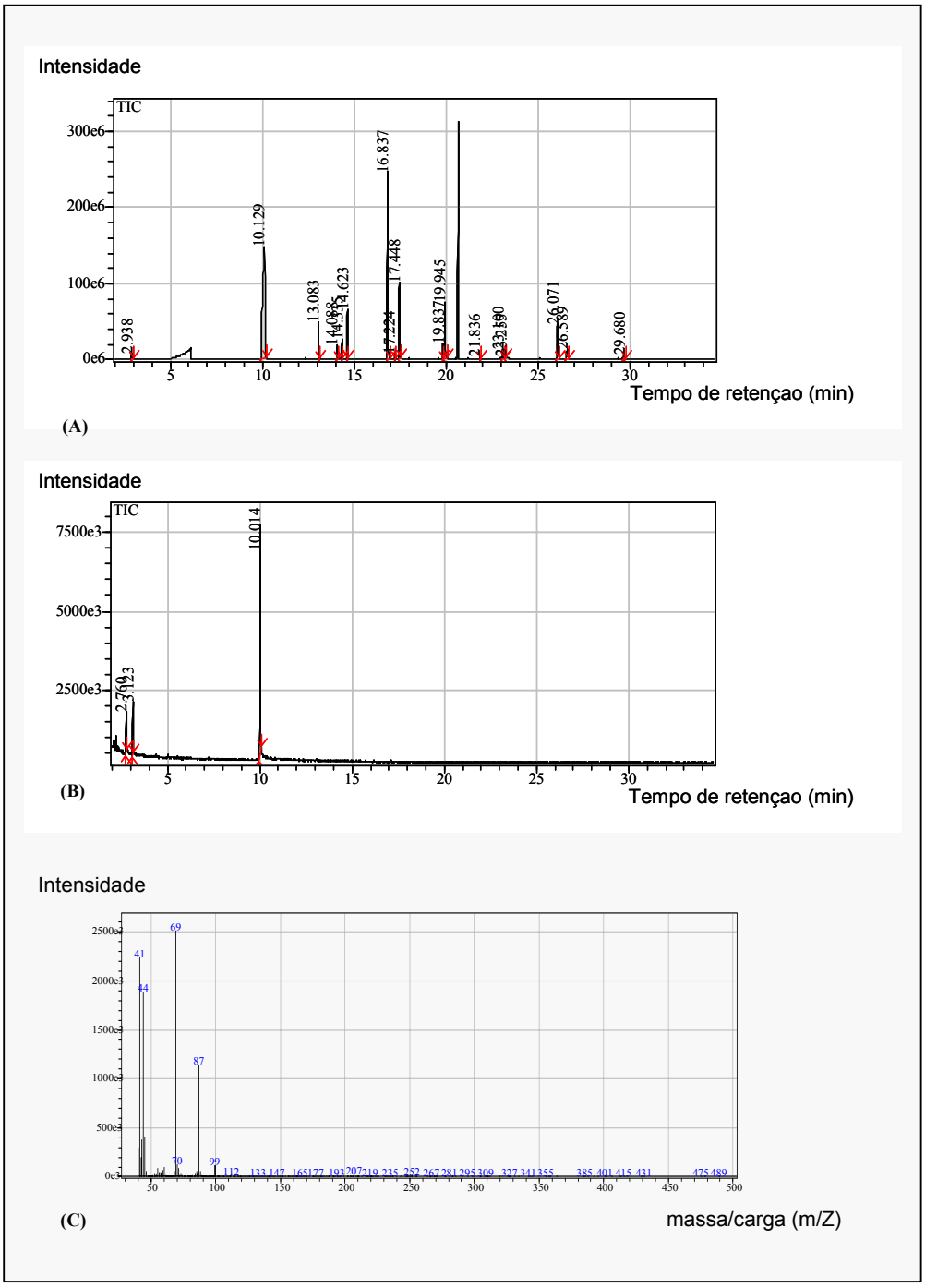


FIGURA 20 - (A) Cromatograma padrão do sistema Clearfil SE Bond (primer + adesivo); (B) Cromatograma da difusão do sistema Clearfil SE Bond pela dentina (análise do eluato); (C) Espectro de massas da substância detectada em B e identificada como HEMA (tempo de retenção 10.014 min) por comparação com o espectro de massas obtido para o HEMA puro.

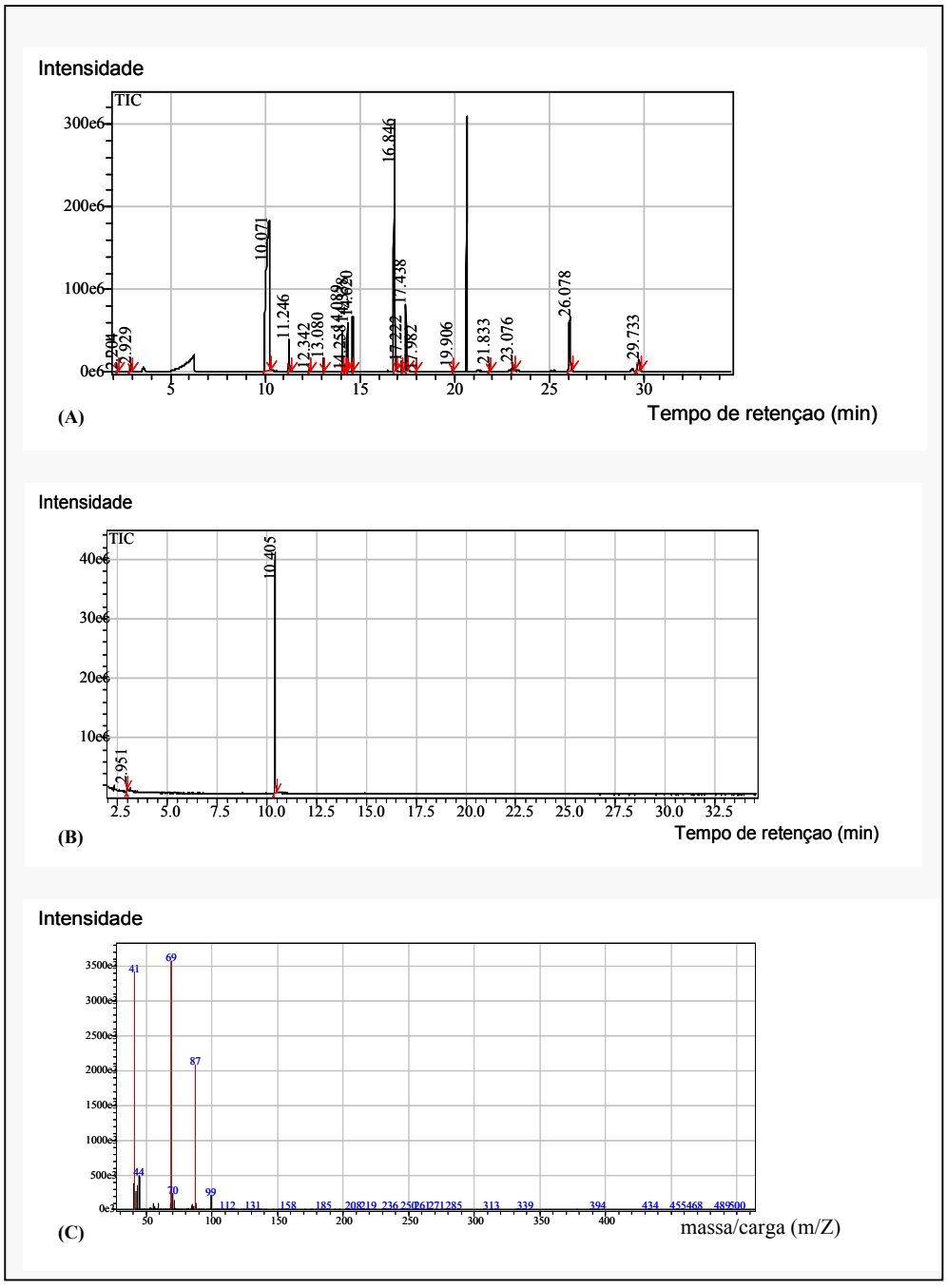


FIGURA 21 - (A) Cromatograma padrão do sistema Clearfil Protect Bond (primer + adesivo); (B) Cromatograma da difusão do sistema Clearfil Protect Bond pela dentina (análise do eluato); (C) Espectro de massas da substância detectada em B e identificada como HEMA (tempo de retenção 10.045 min) por comparação com o espectro de massas obtido para o HEMA puro.

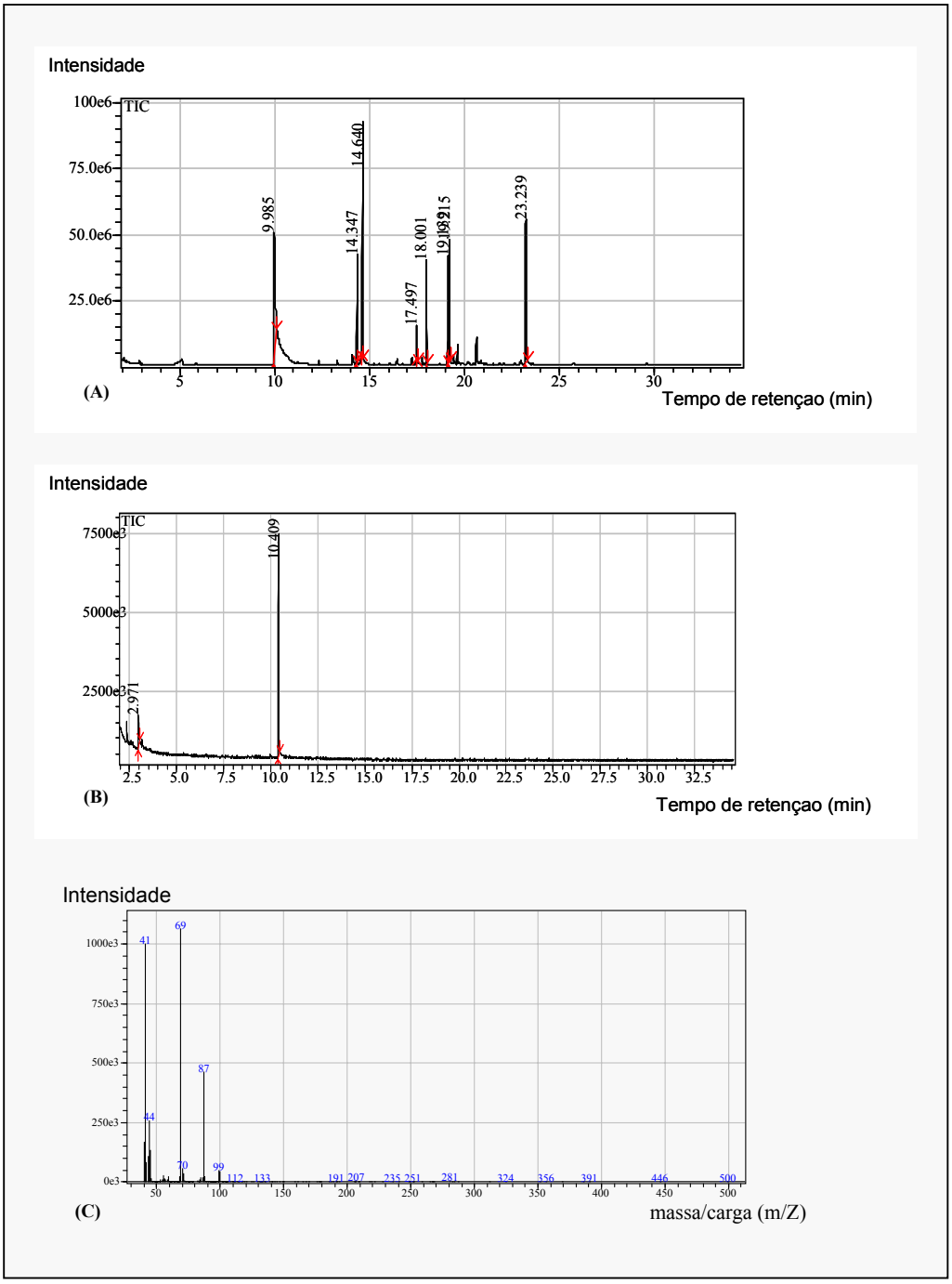


FIGURA 22 - (A) Cromatograma padrão do sistema Adper Prompt L-Pop (primer + adesivo); (B) Cromatograma da difusão do sistema Adper Prompt L-Pop pela dentina (análise do eluato); (C) Espectro de massas da substância detectada em B e identificada como HEMA (tempo de retenção 10.409 min) por comparação com o espectro de massas obtido para o HEMA puro.

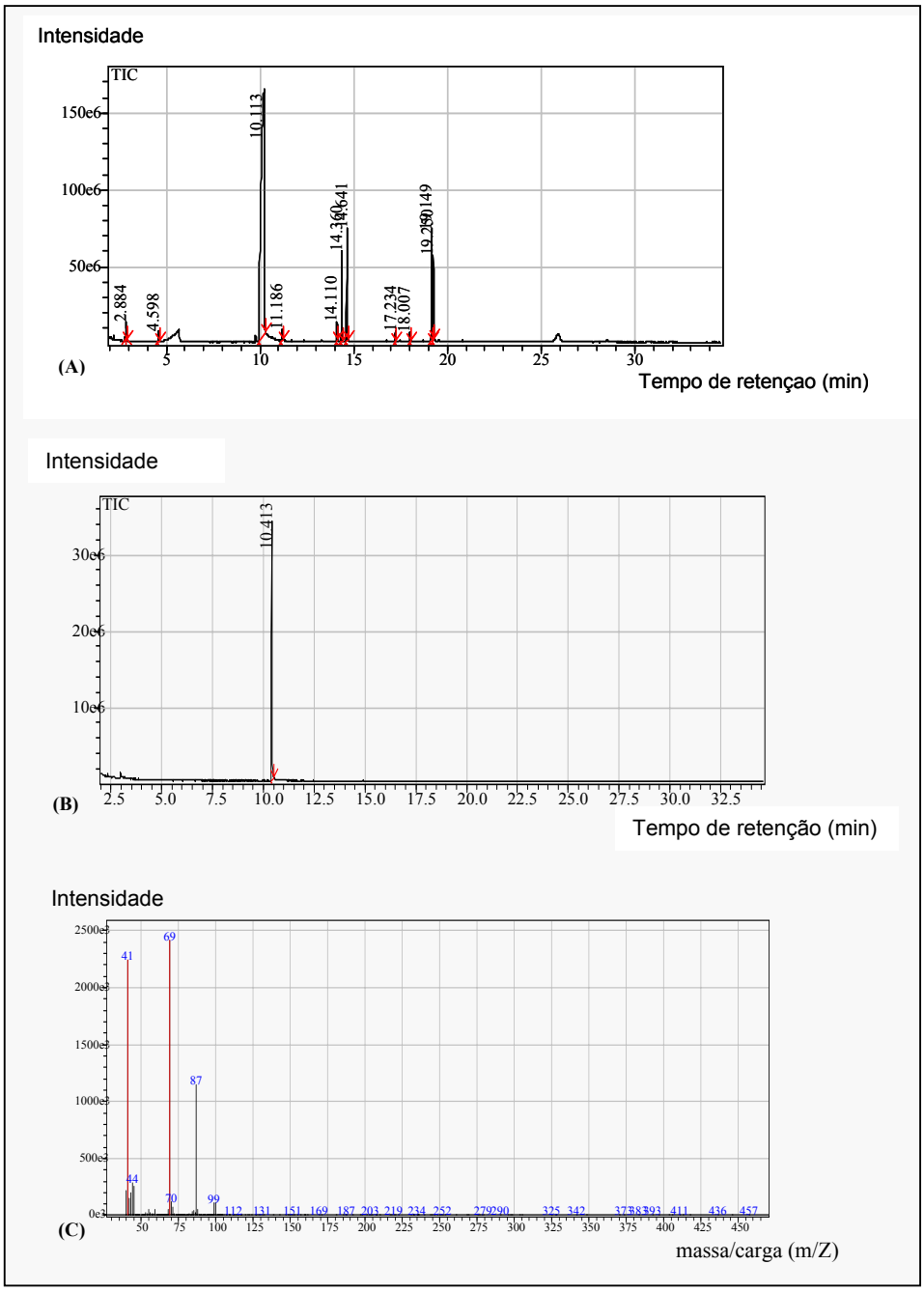


FIGURA 23 - (A) Cromatograma padrão do sistema Xeno III (primer + adesivo); (B) Cromatograma da difusão do sistema Xeno III pela dentina (análise do eluato); (C) Espectro de massas da substância detectada em B e identificada como HEMA (tempo de retenção 10.413 min) por comparação com o espectro de massas obtido para o HEMA puro.

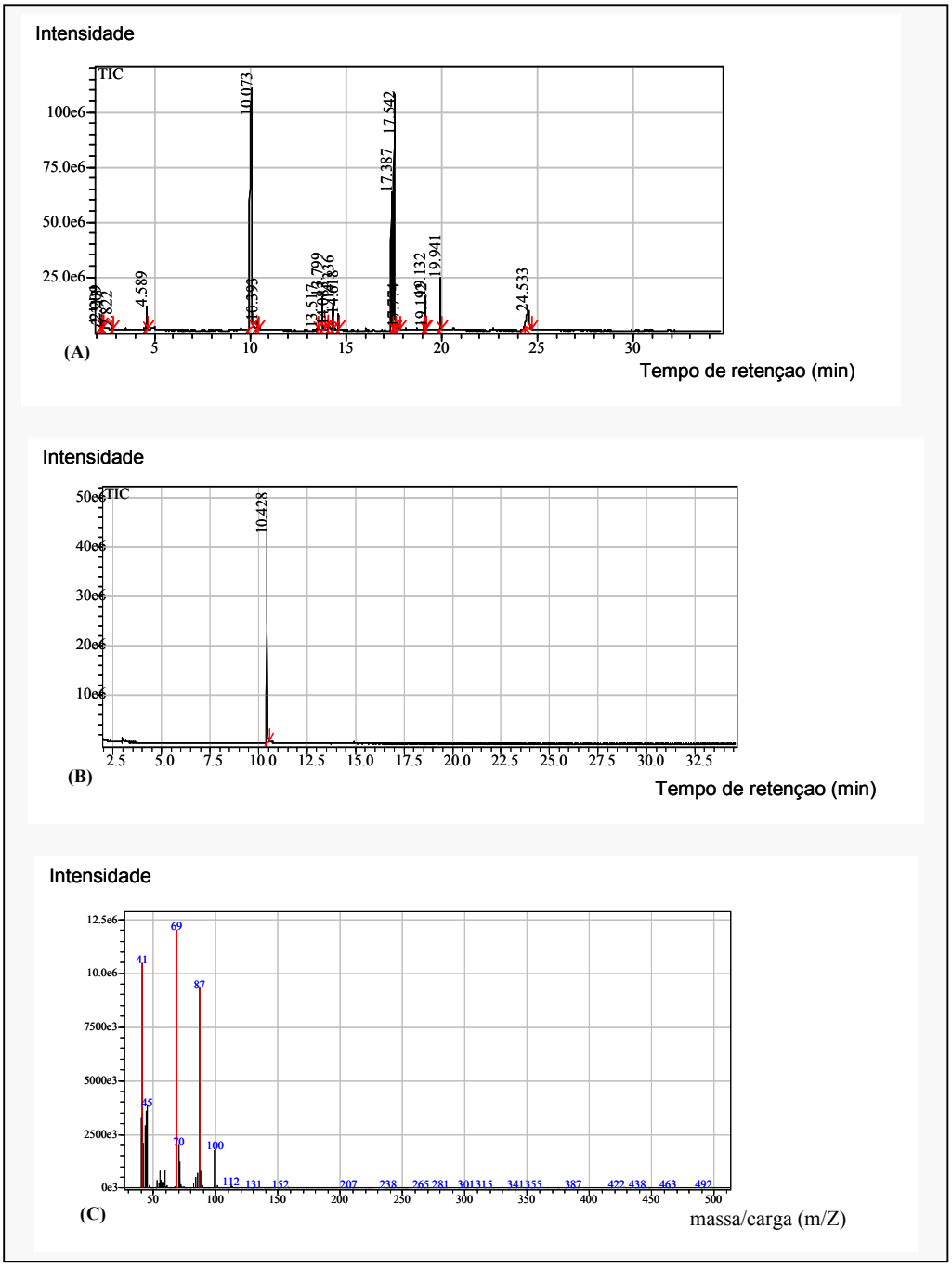


FIGURA 24 - (A) Cromatograma padrão do sistema Single Bond (primer + adesivo); (B) Cromatograma da difusão do sistema Single Bond pela dentina (análise do eluato); (C) Espectro de massas da substância detectada em B e identificada como HEMA (tempo de retenção 10.428 min) por comparação com o espectro de massas obtido para o HEMA puro.

As fotomicrografias da interface dentina-adesivo mostraram a presença de pequenos glóbulos ao longo dos túbulos dentinários, sugestivos de monômeros dos sistemas adesivos em difusão. Estas estruturas foram mais freqüentes no sistema Single Bond (controle positivo)(Figura 25).

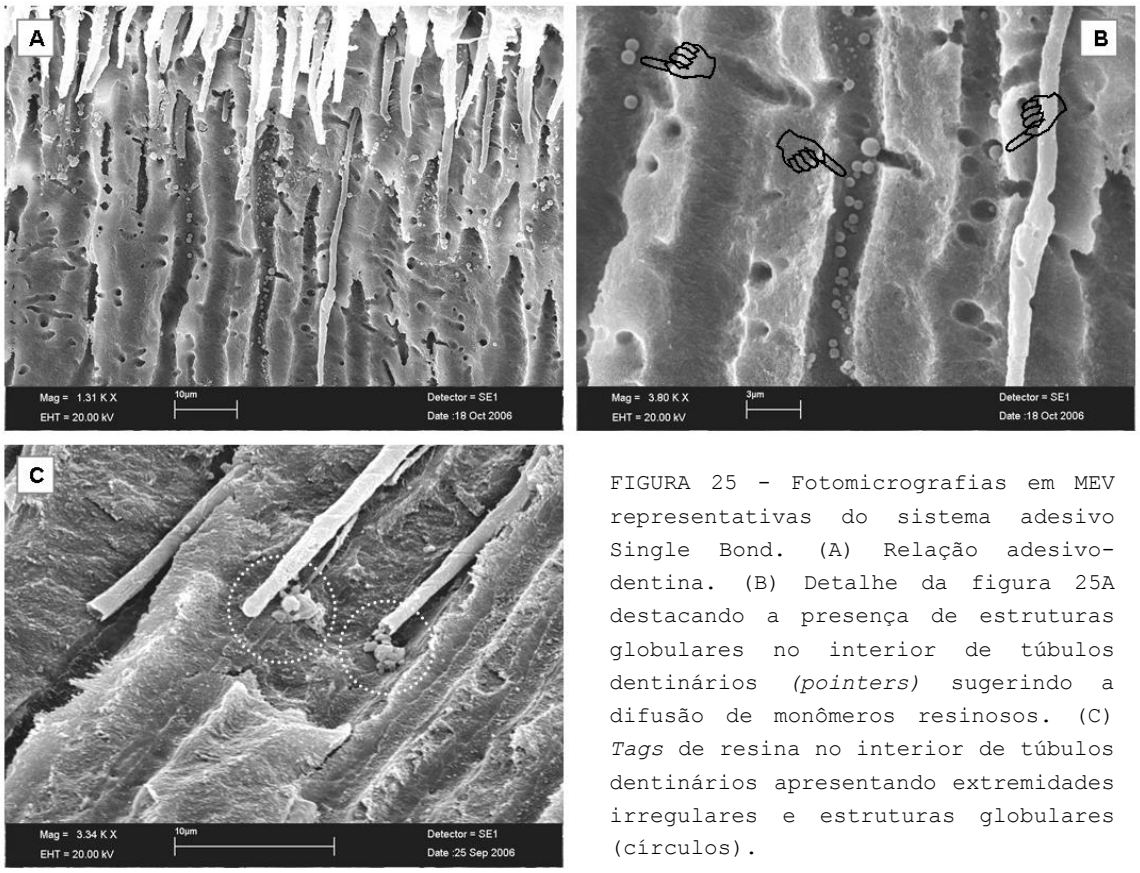


FIGURA 25 - Fotomicrografias em MEV representativas do sistema adesivo Single Bond. (A) Relação adesivo-dentina. (B) Detalhe da figura 25A destacando a presença de estruturas globulares no interior de túbulos dentinários *(pointers)* sugerindo a difusão de monômeros resinosos. (C) *Tags* de resina no interior de túbulos dentinários apresentando extremidades irregulares e estruturas globulares (círculos).

Tags de resina com configuração trapezoidal e finas projeções laterais foram claramente visualizados nas interfaces produzidas com o sistema Single Bond (Figura 25A). Alguns tags apresentavam extremidades irregulares sugerindo a liberação de componentes resinosos, os quais foram observados em íntimo contato com essas extremidades (Figura 25C). As mesmas

características estruturais não foram observadas para nenhum dos demais sistemas adesivos (Figuras 26 a 29).

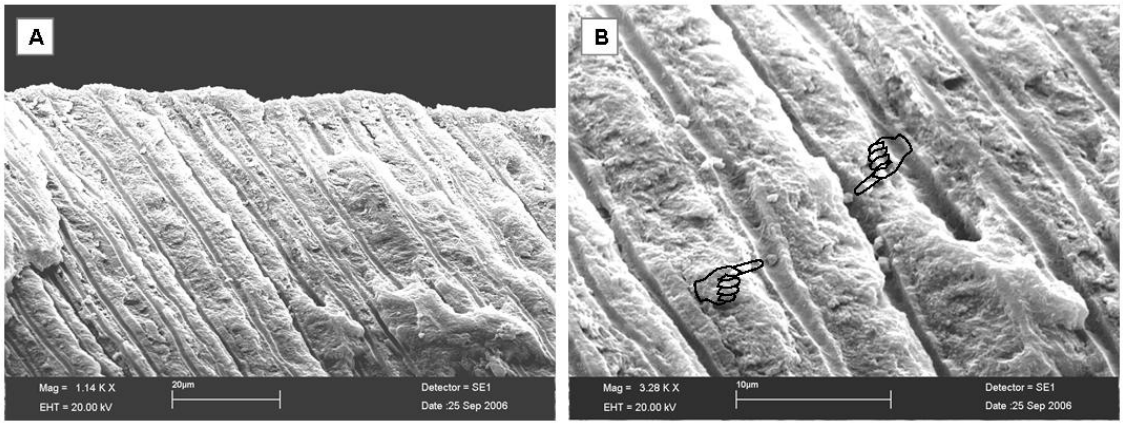


FIGURA 26 – Fotomicrografias em MEV representativas do sistema Xeno III. (A) Interface adesiva, relação sistema adesivo-dentina; (B) Detalhe da Figura 26A destacando a presença de estruturas globulares no interior de túbulos dentinários (*pointers*)embora não tenha sido identificada a formação de *tags* de resina.

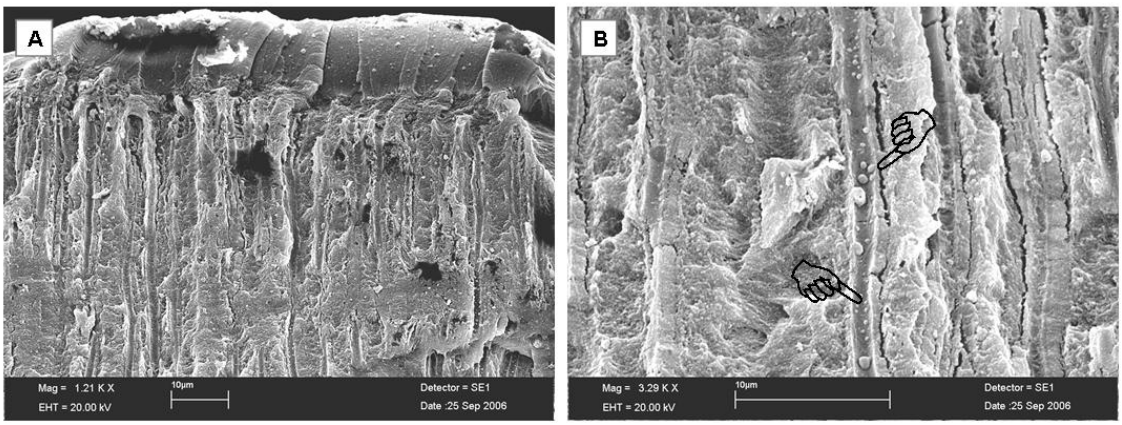


FIGURA 27 – Fotomicrografias em MEV representativas do sistema Adper Prompt L-Pop. (A) Interface adesiva, relação sistema adesivo-dentina; (B) Detalhe da figura 27A destacando a presença de estruturas globulares no interior o túbulo dentinário (*pointer*) sugestivas do deslocamento de material resinoso. Ausência da formação de *tags* de resina.

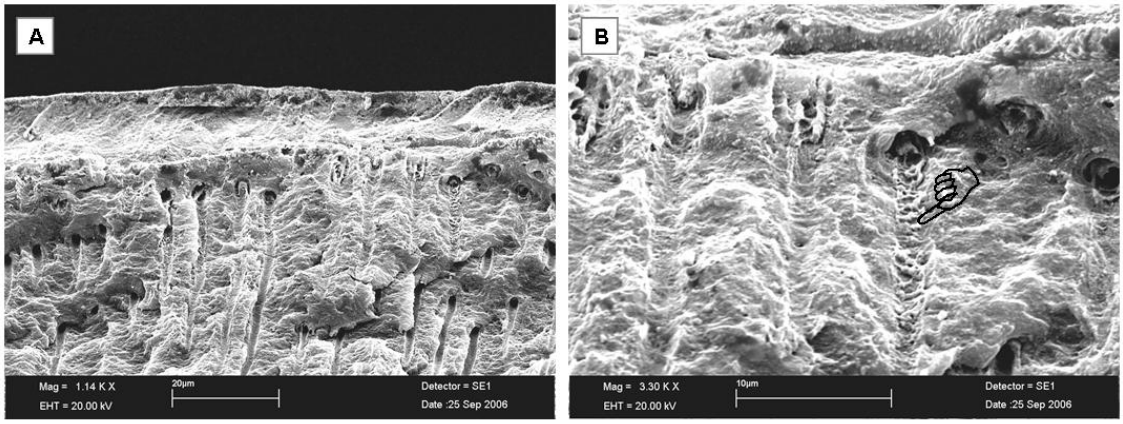


FIGURA 28 – Fotomicrografias em MEV representativas do sistema Clearfil Protect Bond aplicado sobre os discos de dentina recuperados após o teste de metabolismo celular e fraturados ao meio. (A) Interface adesiva, relação sistema adesivo-dentina; (B) Detalhe da figura 28A destacando a presença de estruturas irregulares no interior o túbulo dentinário (*pointer*) sugestivas da deposição de material resinoso nas paredes tubulares. *Tags* de resina não foram evidenciados.

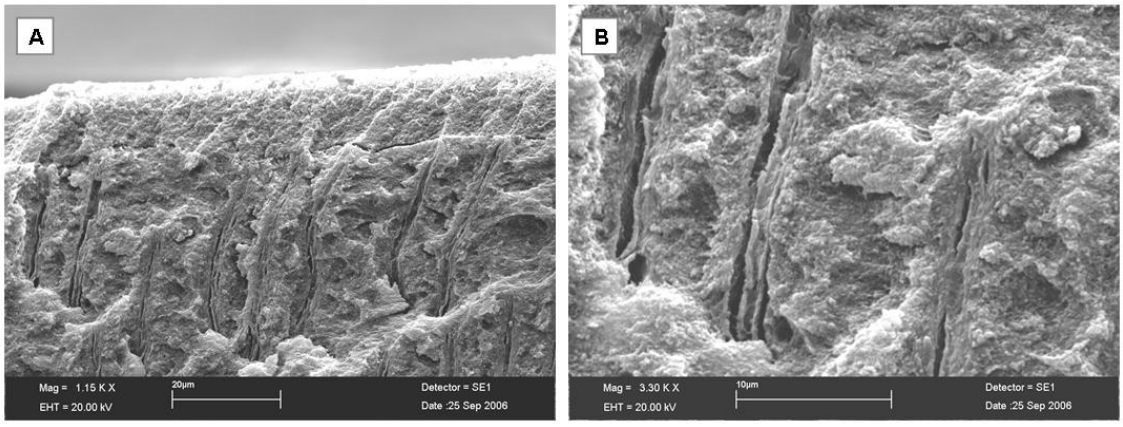
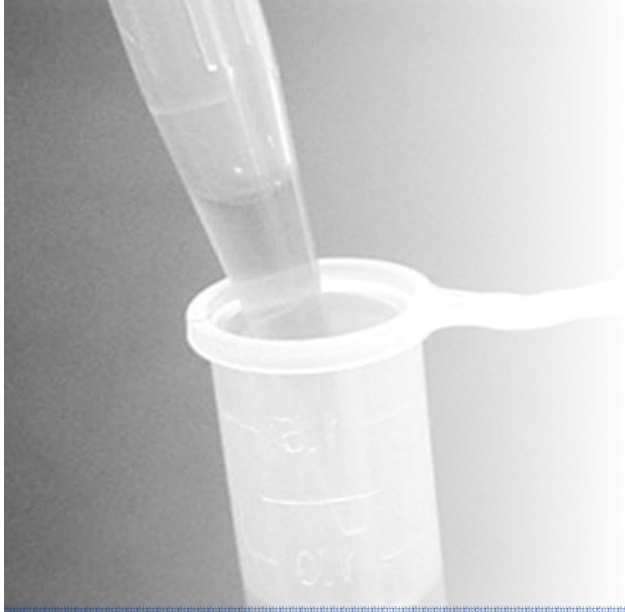


FIGURA 29 – Fotomicrografias em MEV representativas do sistema Clearfil SE Bond aplicado sobre os discos de dentina recuperados após o teste de metabolismo celular e fraturados ao meio. (A) Interface adesiva, relação sistema adesivo-dentina; (B) Detalhe da figura 29A demonstrando ausência de formação de *tags* de resina.



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os testes de barreira dentinária têm sido amplamente utilizados para avaliar efeitos tóxicos dos materiais dentários[1,4,10,23,30,38,62,71] e ajudam a compreender como as características desse substrato, o qual apresenta variações intrínsecas complexas que resultam em grande heterogeneidade regional, podem afetar a difusão de moléculas até o tecido pulpar[33]. Também possibilitam a avaliação do potencial citopático de materiais indicados para uso sobre esse substrato, permitindo a melhor reprodução, em laboratório, das diversas situações clínicas.

O principal problema envolvido nestes testes é a extensa variabilidade metodológica resultante da falta de critérios de padronização, o que impossibilita a direta comparação de resultados entre trabalhos[30]. O tipo de célula alvo representa uma dessas variáveis. No presente estudo, utilizou-se uma linhagem celular (MDPC-23) derivada do tecido pulpar, cujas células apresentam expressão gênica semelhante a de odontoblastos, incluindo a síntese de colágeno tipo I, sialoproteína e fosfoforina da dentina[30,67]. Além disso, foi utilizado um dispositivo, desenvolvido a partir do modelo proposto por Hanks et al.[31] (1988), o qual permitiu o cultivo celular diretamente sobre o lado pulpar dos discos de dentina, simulando in vitro, as condições anatômicas observadas in vivo, onde os odontoblastos são as primeiras células a entrarem em contato com componentes difundidos pelo tecido dentinário. Este

fato possibilitou também que o contato material-células acontecesse sem que esses componentes sofressem diluição pelo líquido do compartimento inferior do dispositivo, um dos problemas relacionados com esta técnica[30]. Dessa forma, utilizando esse modelo experimental, todos os sistemas adesivos autocondicionantes resultaram em redução significante da viabilidade celular, a qual variou entre 28,0% a 47,8%. Entretanto, a maior redução foi observada para o sistema convencional simplificado Single Bond (53,1%), utilizado no presente estudo como controle positivo.

A citotoxicidade de sistemas adesivos que requerem condicionamento ácido como passo separado tem sido demonstrada ser superior a de sistemas adesivos autocondicionantes[38,62,71], os quais são considerados em alguns estudos, como levemente citopáticos[38,71]. Vajrabhaya et al.[71] (2003) avaliaram o efeito citotóxico do sistema autocondicionante One Up Bond F e encontraram uma viabilidade celular de 93% comparada a de apenas 60% observada para os sistemas com condicionamento ácido prévio, Single Bond, Syntac Single Component e Prime & Bond 2.1. Da mesma forma, a viabilidade celular do sistema convencional Single Bond obervada nesse estudo (53,1%) foi inferior a viabilidade média observada para os sistemas autocondicionantes (41,1%). A diferença de comportamento tóxico entre sistemas convencionais e autocondicionantes tem sido atribuída ao fato de que os primeiros, por removerem completamente a *smear layer* e *smear plugs*, e conjuntamente ampliarem a luz dos túbulos dentinários pela dissolução da dentina peritubular, favorecem a

difusão transdentinária de substâncias diversas, incluindo as indesejáveis do ponto de vista toxicológico[71]. Uma vez que a presença ou ausência da *smear layer* afeta a permeabilidade dentinária, a sua remoção implica na perda de uma importante barreira para permeação de solutos e solventes[57].

Em contrapartida, essas alterações impostas pelo condicionamento da dentina com ácidos fortes poderiam ofecer alguma resistência à difusão de componentes tóxicos na presença de pressão pulpar positiva, uma vez que resultam em aumento de sua condutância hidráulica (ou seja, a facilidade com que o fluido pode se mover pela dentina) em 5 a 40 vezes[55,60]. Em adição, por ser o ácido fosfórico uma solução hipertônica (6070mOsm/Kg) o fluido dentinário é atraído transitoriamente para a superfície devido à pressão osmótica produzida[54]. Consequentemente, o efeito citotóxico de algumas substâncias pode ser reduzido na presença de perfusão dentinária[62], o que parece ser material dependente[21]. Bouillaguet et al.[5] (1996) mostraram que aumentando a pressão convectiva de zero para 10 cm de H_2O houve redução de difusão de HEMA pela dentina. Porém, esta pressão, se estática, reduziu, mas não impediu a difusão de monômeros[22]; ao passo que uma simulação de pressão pulpar pulsátil aumentou a citotoxicidade de resinas adesivas porque aumentou a difusão de componentes[7].

Como neste estudo os experimentos foram desenvolvidos sem indução de pressão pulpar, este efeito parcialmente protetor não existiu, o que pode ter contribuído para os altos valores de citotoxicidade encontrados. Entretanto, é importante salientar

que algumas situações in vivo, como a injeção de anestésico local contendo vasoconstritor, também causam redução significante na exsudação do fluído dentinário através dos túbulos dentinários em decorrência da diminuição da pressão intrapulpar. Essa condição, in vivo, poderia facilitar a difusão transdentinária de solutos, resultando no aumento da sua concentração local[51].

Apesar do possível aumento da exudação transdentinária induzida pela elevada osmolaridade do ácido fosfórico, no presente estudo, a mesma não foi suficiente para contrapor o alto efeito citopático produzido pelo sistema Single Bond. A presença de estruturas globulares acompanhando a luz dos túbulos dentinários foi evidente nos espécimes tratados com esse sistema, quando avaliados em MEV. Tais estruturas sugerem a difusão transdentinária de glóbulos resinosos não polimerizados, a qual foi ratificada pela detecção de HEMA em todos os eluatos obtidos após 24 horas da aplicação desse material.

Enquanto a *smear layer* reduz a condutância hidráulica em 80-90%[56,60], seu efeito sobre a redução na difusão de solutos é de apenas 25-30%[19,56]. Desta forma, é possível afirmar que a *smear layer* por si só, não constitiu uma barreira impermeável à difusão de produtos provenientes de materiais sobre ela aplicados. Apesar desse fato, têm sido postulado que os efeitos citotóxicos produzidos por sistemas autocondicionantes estão relacionados, entre outros fatores, à capacidade desses materiais de dissolverem a *smear layer* e desmineralizarem a dentina subjacente, denominada por Tay, Pashley[68] (2001) de

agressividade. O tipo do monômero ácido empregado, o seu pK_a, sua concentração, a duração da aplicação, a osmolaridade, a viscosidade, a concentração de água e o pH do sistema são fatores determinantes da agressividade de cada material[41,68].

Os sistemas de dois passos, Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond utilizam um primer autocondicionante que contém um éster fosfato metacrilado insaturado (MDP) como monômero resinoso ácido (em concentração de 25-30%), o qual não é considerado forte suficiente para dissolver completamente a *smear layer* (pH 1,9). Esses sistemas são considerados de agressividade moderada[68]. Apesar disso, apresentam capacidade de difusão através dessa estrutura e desmineralização da superfície da dentina subjacente a uma profundidade de 0,5 µm, formando autênticas camadas híbridas com essa espessura. Já os sistemas de passo único, Adper Prompt e Xeno III, em função dos seus baixos valores de pH (0,8 e 1,0 respectivamente) dissolvem quase que completamente a *smear layer* e desmineralizam a dentina subjacente em maior profundidade sendo, consequentemente, considerados de alta agressividade. O sistema Adper Prompt contém uma mistura de mono e diésteres de ácido fosfórico metacrilados (em concentração de 80%) capazes de desmineralizar a superfície da dentina com formação de uma autêntica camada híbrida de 3,5-4,0 µm de espessura[68], semelhante àquela produzida pelos sistemas que utilizam condicionamento ácido prévio, como o sistema Single Bond investigado no presente estudo. No sistema Xeno III a presença dos componentes Piro-HEMA (tetra-metacriloxietil pirofosfato) e PEM-F (pentametacriloxietil ciclo

fosfazen monofluor) formam grupos de ácido fosfórico livres que tornam a mistura fortemente ácida. O PEM-F libera íons flúor, os quais agem como varredores (*scavengers)* de íons cálcio, aumentando o efeito condicionante do Pyro-HEMA (Protocolo do Xeno III – Dentsply).

Apesar das variações de pH influenciarem diretamente na capacidade dos sistemas autocondicionantes de dissolver a *smear layer* e desmineralizar a dentina subjacente, o que reflete na profundidade de penetração no substrato dentinário e na morfologia da interface adesiva[41,68], neste estudo não foi observada relação direta entre essa característica e a citotoxicidade desses sistemas, demonstrando que outros fatores foram mais importantes para a resposta biológica ao material.

A maioria das substâncias se move pela dentina por difusão simples, a qual varia diretamente com a concentração molar e indiretamente com o peso molecular. Quando substâncias são aplicadas sobre a dentina, saturam o fluido dentinário adjacente e começam a se difundir seguindo o gradiente de concentração em direção ao espaço pulpar, com velocidade inversamente relacionada à distância[52]. Isso significa que quanto mais espessa a dentina, maior parte da concentração aplicada é dissipada pela distância e vice-versa[5,29,33]. Além da extensão, a densidade e o diâmetro dos túbulos, assim como a temperatura são importantes fatores na difusão transdentinária[52,54]. Outro mecanismo para o transporte de solutos e solventes pela dentina é a filtração ou transporte convectivo, que diferentemente da difusão está relacionada ao gradiente de pressão[51].

Consequentemente, a espessura dentinária remanescente é um dos fatores mais importantes que afetam a permeabilidade da dentina, uma vez que esta aumenta exponencialmente à medida que a dentina é reduzida na direção ocluso-pulpar[29,51]. Porém, devido as grandes variações na permeabilidade de um dente para outro e regionalmente no mesmo dente, áreas com a mesma espessura de dentina apresentam variações de permeabilidade, as quais podem refletir diretamente nos resultados dos testes de citotoxicidade[1,5].

Considerando-se a importância do controle destas variáveis durante os estudos que envolvem a permeabilidade dentinária, cuidados especiais foram tomados na obtenção dos discos de dentina. Os discos utilizados neste estudo foram produzidos da região mais profunda da coroa que permitisse a obtenção de uma superfície plana sem a projeção dos cornos pulpares, com uma espessura de 0,4 mm, tentando reproduzir a dentina de preparos bastante profundos. Estudos têm mostrado que 0,5 mm de dentina remanescente é uma importante barreira contra desafios iatrogênicos e patológicos[21,33,62]. A mensuração da condutância hidráulica destes discos pelo sistema Flodec permitiu que discos impermeáveis fossem excluídos do estudo, assim como uma distribuição homogênea dos mesmos, de tal forma que a condutância hidráulica média dos grupos experimentais fosse estatisticamente semelhante ($p > 0,05$). Entretanto, não foi encontrada correlação entre estes valores e os de citotoxicidade avaliados pelo teste de MTT, mostrando que neste estudo, a condutância hidráulica não interferiu na viabilidade celular

encontrada. Isso ocorreu provavelmente, devido à rígida seleção dos discos.

Componentes metacrilatos liberados e difundidos através do tecido dentinário induzem a variada citotoxicidade e efeitos metabólicos no tecido pulpar, como reações imunológicas locais[39], reação inflamatória crônica[14,16], genotoxicidade[42] e apoptose[2,44,49,65]. Recentemente, também tem sido demonstrado que monômeros como HEMA e TEGDMA causam esgotamento de glutationa intracelular (a qual é responsável pela proteção celular frente ao efeito tóxico de xenobióticos e oxidantes endógenos) e aumento dos níveis de espécies de oxigênio reativo (os quais levam ao estresse e paralisação do ciclo celular, importante gatilho para a apoptose)[11,61,64]. Dessa forma, a capacidade celular de proteção contra agentes tóxicos, tais como os componentes resinosos, é enfraquecida, resultando em morte celular[3,72]. A partir dos resultados observados no presente estudo, também é possível afirmar que entre os efeitos citotóxicos produzidos pelos monômeros difundidos está a interferência na respiração mitocondrial com subseqüente morte celular. O mesmo efeito deletério foi observado em outros trabalhos com a mesma linhagem celular ou linhagens diferentes[2,5,7,17,62,64,71,74].

A composição e a quantidade de componentes liberados parece exercer papel fundamental no comportamento biológico dos sistemas adesivos[2,4,17,26,40,70]. Monômeros tóxicos difundidos pelo tecido dentinário, atingindo as células subjacentes, são provenientes de duas fontes: (1) moléculas residuais não convertidas em polímeros após a finalização do processo de

polimerização, ou (2) moléculas liberadas pela degradação hidrolítica do polímero em função do tempo. De maneira geral, a dissolução de adesivos resinosos polimerizados em meio aquoso pode atingir valores de 1,5-2,5% do seu peso total, dos quais, 5-10% são monômeros residuais não convertidos[40]. No presente estudo, uma vez que a avaliação do metabolismo celular e do meio de cultura foi realizada após 24 horas da aplicação dos sistemas adesivos, o efeito citopático produzido e os componentes detectados na CG/EM representam monômeros residuais não convertidos. Ratificando os resultados de vários estudos[4,5,23,29,36,71], nossos resultados demonstraram que a concentração com a qual esses monômeros alcançam o espaço pulpar é potencialmente tóxica e resulta em redução significante da vialibidade celular associada a alterações morfológicas evidentes das células alvo. Tais alterações foram caracterizadas em MEV pela perda dos prolongamentos citoplasmáticos e contração do citoesqueleto, resultando em perda de adesão ao substrato dentinário e redução do número de células.

Na análise em CG/EM, o monômero HEMA foi prontamente identificado como produto de difusão para todos os sistemas adesivos aplicados sobre a dentina, sendo diretamente relacionado à citotoxicidade encontrada. A rápida difusão desse monômero ocorre em função do seu baixo peso molecular (130,14) e característica hidrófila. Entretanto, como é um componente comum a todos os adesivos testados, sua análise apenas qualitativa dificultou uma comparação precisa entre os grupos. Bouillaguet et al.[4] (1998) observaram uma alta liberação de HEMA nos

primeiros 4 minutos após a polimerização de sistemas adesivos, atribuindo esta rápida liberação aos monômeros não-polimerizados ou pobremente polimerizados e à facilidade de difusão dessas moléculas menores. Estes autores afirmaram que o HEMA nos co-monômeros líquidos apresenta potencial para difusão dentro do fluido dentinário durante os 15-30 s requeridos para adesão. Resultados semelhantes foram obtidos por Çetinguç et al.[10] (2006), que encontraram difusão de HEMA significante após 4 horas, mostrando que a maior difusão ocorreu nos períodos iniciais da adesão (50% da quantidade cumulativa de 72h).

Além do HEMA, outros monômeros como o TEGDMA (trietileno glicol dimetacrilato) têm sido identificados em extratos aquosos de materiais resinosos[2,26,37,40] e também como produtos de difusão transdentinária[4,23,29]. Ambos monômeros metacrilados apresentam potencial citotóxico[25,32,59,73] e de indução de apoptose[2,65]. Geurtsen et al[26]. (1999), analisaram extratos aquosos de vários agentes adesivos dentinários e mostraram citotoxicidade significantemente variável, a qual dependia diretamente da quantidade de componentes químicos, tais como TEGDMA, HEMA, co-monômeros e reagentes iniciadores, presentes nos materiais resinosos investigados.

Muitos monômeros amplamente usados na composição dos adesivos dentinários, tais como o Bis-GMA e UDMA são hidrófobos e não difundem bem sob as condições aquosas encontradas in vivo[29,66,74], diferentemente do HEMA[5,24,33,74]. Embora não identificados nas amostras deste estudo, pela ausência ou pequena difusão (abaixo dos níveis de detecção do método

empregado), outras pesquisas utilizando a mesma análise por CG/EM[2,37] identificaram a presença desses monômeros. De uma forma geral, os metacrilatos voláteis e semi voláteis, monômeros e co-monômeros pequenos e aditivos podem ser facilmente identificados por CG/EM[24,26,37], enquanto que os monômeros maiores, não-voláteis como o Bis-GMA, UDMA e UEDMA são mais facilmente detectados pelo método da cromatografia líquida[37]. Por outro lado, os materiais resinosos investigados consistem de combinações de componentes que podem apresentar entre si efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos[59]. Há relatos na literatura de efeitos sinérgicos do HEMA e Bis-GMA, por exemplo, onde combinações binárias foram citotóxicas em doses menores que os monômeros isoladamente[59].

Surpreendentemente, dos sistemas autocondicionantes investigados, o Adper Prompt apresentou o menor efeito citotóxico (redução do metabolismo celular de 25,3%), a despeito da sua aplicação ativa, alta concentração de HEMA, especialmente no compartimento A (MSDS 75-90%) e inferior extensão de polimeralização quando comparada com a dos demais sistemas autocondicionantes investigados[46]. O menor grau de conversão monômero-polímero, também denominado de extensão de polimerização, está diretamente relacionado a quantidade de monômeros residuais. Pode acarretar em pequena resistência de união, alta susceptibilidade a degradação e também em continuidade da desmineralização dentinária mesmo após a fotoativação do adesivo[47]. Além do mais, o sistema Adper Prompt é considerado agressivo quanto a sua capacidade de dissolução da *smear layer* e desmineralização da dentina subjacente, sendo as

camadas híbridas formadas comparáveis as produzidas por sistemas convencionais como o Single Bond[68]. Os estudos desenvolvidos por Schmalz et al.[62] (2002) e Galler et al.[21] (2005) também demonstraram bons resultados para esse sistema adesivo. Entretando, diferiram dos resultados do presente estudo uma vez que, em função da espessura da dentina sobre a qual o sistema Adper Prompt foi aplicado (0,3 mm e 0,5 mm), houve aumento da atividade enzimática celular tanto na presença como na ausência de perfusão. Em nenhum dos estudos foram apresentadas justificativas para tal efeito indutor, sendo que Galler et al.[21] (2005) atestaram que o mecanismo de ação do sistema Adper Prompt, nesse caso, permanece sem explicações conclusivas. Uma vez que partículas de carga atuam como agentes agressivos para o tecido pulpar[9], pode ser especulado que, pelo menos em parte, o menor efeito citotóxico desse sistema observado no presente estudo, deva-se a ausência dessas partículas vítreas em sua composição, o que não ocorre para os demais sistemas autocondicionantes investigados. Também, a menor citotoxicidade desse sistema poderia ser em parte atribuída ao menor tempo de contato do mesmo com o tecido dentinário previamente a ativação pela luz. Enquanto os sistemas Clearfil SE Bond, Protect Bond e Xeno III permaneceram em contato com o substrato por 20 segundos, o Adper Prompt foi aplicado por apenas 15 segundos.

Os sistemas Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond e Xeno III apresentaram efeito tóxico comparável sobre as células odontoblastóides, sem diferença estatisticamente significante entre eles. Uma distinção composicional básica entre os sistemas

Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond é a presença de um monômero antibacteriano 12-metacriloiloxi-dodecilpiridinium brometo (MDPB) na formulação do último. Entretanto, do ponto de vista de citotoxicidade, tem sido demonstrado que esse monômero não apresenta efeito deletério significante[38], o que foi ratificado pelos resultados do presente estudo. Outra diferença entre esses sistemas é a presença de fotoiniciadores (CQ) nos dois componentes do Clearfil SE Bond, enquanto para o Clearfil Protect Bond, fotoiniciadores estão presentes apenas no componente *bond*. Segundo Nunes et al.[46] (2006), a presença de fotoiniciadores no *primer* é um dos principais fatores determinantes da evaporação de solventes. Esses autores demonstraram que o sistema Clearfil SE Bond apresentou a maior extensão de polimerização quando comparado aos sistemas Xeno III e Adper Prompt.

O sistema Xeno III apresenta uma alta porcentagem de monômeros hidrófilos e a presença do estabilizador BHT (tolueno hidroxil butilado) em ambos frascos, o que compromete sua polimerização[6] e resulta em um aumento na concentração de monômeros residuais. Apesar de ser o único entre os autocondicionantes investigados que possui além da água, também etanol como solvente, segundo Nunes et al.[46] (2006), a tentativa de remoção dos solventes aumentando o tempo de secagem (de 5 para 40 segundos) e a temperatura do ar (de 21°C para 38°C), não exerceu influência na conversão polimérica desse sistema adesivo. Xeno III juntamente com o sistema Adper Prompt apresentam baixa porcentagem de conversão monômero-polímero e são altamente

permeáveis, uma vez que essas duas propriedades são inversamente proporcionais[6]. Entretanto, Ergün et al.[20] (2007), assim como no presente estudo, também demonstraram que a citotoxicidade desse sistema adesivo foi comparável à citotoxicidade do Clearfil SE Bond, com valores de sobrevivência celular de 65% e 61%, respectivamente.

Detalhes da estruturação química dos componentes de cada sistema adesivo são importantes para esclarecer diferenças na ação citopática desses materiais, uma vez que os efeitos tóxicos dos acrilatos e metacrilatos usados nos materiais resinosos varia em função do tamanho da cadeia polimérica, grupos funcionais presentes nos monômeros, lipofilia, ou seja, a capacidade de se incorporar na superfície de biomembranas lipídicas ou de solubilizá-las[74] e outras particularidades que merecem futura e aprofundada apreciação.

Como considerações finais, pôde ser demonstrado pela presente investigação, que componentes químicos advindos de materiais odontológicos aplicados diretamente sobre a dentina profunda (0,4 mm de remanescente), apresentam potencial tóxico sobre células pulpares. Essa toxicidade é dependente das características químicas e concentrações com as quais tais componentes alcançam o espaço pulpar e não da capacidade de dissolução da *smear layer* e desmineralização da dentina subjacente apresentada por cada sistema adesivo autocondicionante. Tal evidência contradiz estudos nos quais a idéia de que apenas a presença de microrganismos seria a responsável pelas reações do tecido pulpar após procedimentos

clínicos restauradores[18,63]. Estudos in vivo são, entretanto, necessários para demonstrar a citotoxicidade dos materiais investigados dentro de um contexto mais amplo, no qual seriam incluídos os eventos vasculares e celulares envolvidos no processo inflamatório, assim como possível atividade de drenagem de agentes irritantes promovida pelo sistema linfático local.

Todavia, apesar dos resultados de pesquisas in vitro não poderem ser extrapolados diretamente para condições in vivo, os dados científicos obtidos na presente investigação corroboram com diversos estudos, onde diferentes sistemas adesivos aplicados em cavidades profundas preparadas em pré-molares humanos causaram danos severos ao tecido pulpar[28,36], representados por reação inflamatória persistente mediada por células mononucleares associada à reabsorção dentinária interna. Numa pesquisa recente[15], foi demonstrado que o sistema adesivo autocondicionante Clearfil SE Bond, avaliado na presente investigação, também causou danos pulpares significantes, os quais, comparativamente, foram menos intensos do que os induzidos pelos sitemas convencionais, assim como demonstrado na presente investigação para as células em cultura. Desta maneira, os dados científicos obtidos claramente demonstram a capacidade de difusão de componentes resinosos dos diferentes sistemas adesivos avaliados através dos túbulos dentinários e seus efeitos citopáticos sobre as células odontoblastóides cultivadas; e sendo assim, estes dados comprovam que estes componentes caracterizam um importante fator causador de danos

ao complexo pulpar quando da realização de procedimentos adesivos em cavidades muito profundas.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

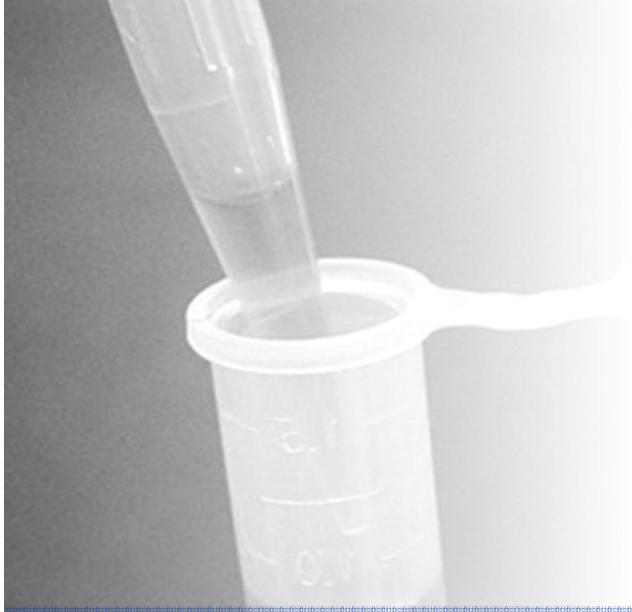
Baseado nos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

1. Todos os sistemas adesivos estudados apresentaram difusão transdentinária e citotoxicidade sobre células odontoblastóides MDPC-23.

2. A citotoxicidade foi estatisticamente maior para o sistema convencional Single Bond.

3. Os sistemas autocondicionantes apresentaram diferenças na citotoxicidade, significativas entre si, não relacionadas à agressividade (pH) do sistema, mas provavelmente as diferenças na sua composição química.

4. O HEMA foi identificado como o único produto de difusão transdentinária de todos os sistemas adesivos estudados.



REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS*

1. Abou Hashieh I, Franquin JC, Cosset A, Dejou J, Camps J. Relationship between dentine hydraulic conductance and the cytotoxicity of four dentine bonding resins in vitro. J Dent. 1998;26:473-7.

2. Becher R, Kopperud HM, Al RH, Samuelsen JT, Morisbak E, Dahlman HJ et al. Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. Dent Mat. 2006;22:630-40.

3. Bereznowski Z. Effect of methyl methacrylate on mitochondrial function and structure. Int J Biochem. 1994;26:1119-27.

4. Bouillaguet S, Virgillito M, Wataha J, Ciucchi B, Holz J. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, in vitro. J Oral Rehabil. 1998;25:45-51.

5. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and dentin permeability of HEMA. J Endod. 1996;22:244-8.

6. Cadenaro M, Antoniolli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Pratti C et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. Eur J Oral Sci. 2005;113:525-30.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:http://www.nlm.nih.gov/bsduniform_requirements.html

7. Camps J, Tardieu C, Déjou J, Franquin JC, Ladaique P, Rieu R. In vitro cytotoxicity of dental adhesive systems under simulated pulpal pressure. Dent Mater. 1997;13:34-42.

8. 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 2005;26:1035-42.

9. Caughman WF, Caughman GB, Shiflett RA, Rueggeberg F, Schuster GS. Correlation of cytotoxity, filler loading and curing time of dental composites. Biomaterials 1991;12:737-40.

10. Çetingüç A, Ölmez S, Vural N. HEMA diffusion from dentin bonding agents in young and old primary molars in vitro. Dent Mater. 2007;23:302-7.

11. Chang HH, Guo MK, kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. Biomaterials 2005;26:745-53.

12. Costa CAS, Hebling J. Avaliação in vitro de sistemas adesivos de dentina aplicados sobre células odontoblastóides. Rev Odont UNESP 2006;35:97-106.

13. 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.

14. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. Dent Mater. 2000;16:188-97.

15. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibiliy od resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. J Biomed Mater Res. 2007;81:175-84.

16. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of an adhesive system and 2-hydroxyethyl metacrilate. J Dent Child. 1999;66:337-42.

17. 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.

18. Cox CF. Biocompatibility of dental materials in the absence of bacterial infection. Oper Dent. 1987;12:146-52.

19. Dippel HW, Borgreven JMPM, Hoppnbrouwers PMM. Morphology and permeability of the dentinal smear layer. J Prosthet Dent. 1984;52:657-62.

20. Ergün G,Egilmez F, Uçtasli MB, Yilmaz S. Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. Int Endod J. 2007;40:216-23.

21. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. J Endod. 2005;31:396-9.

22. Gerzina TM, Hume WR. Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin in vitro. JDent Res. 1995;74:369-73.

23. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. J Dent. 1996;24:125-8.

24. Geurtsen W. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. Eur J Oral Sci. 1998;106:687-95.

25. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res. 1998;41:474-80.

26. Geurtsen W, Spahl W, Müller K, Leyhausen G. Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. J Biomed Mater Res. 1999;48:772-7.

27. Gillette WB. Ethylene oxide sterilization in dentistry. J Oral Ther Pharmacol. 1966;2:440-4.

28. Gwinnett AJ, Tay FR. Early and intermediate time reponse of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. Am J Dent. 1998;11:S35-44.

29. Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. J. Oral Rehab. 1997;24:20-5.

30. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater. 1996;12:186-93.

31. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in an in vitro device. J Oral Pathol. 1988;17:369-403.

32. Hanks CT, Straw SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res. 1991;70:1450-5.

33. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Straw SE, Fat JC. Permeability of biological and synthetic molecules through dentin. J Oral Rehabil. 1994;21:475-87.

34. 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 pappilae. Connect Tissue Res. 1998;37:233-49.

35. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. J. Endod. 1999;25:676-82.

36. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. J Dent. 1999;27:557-64.

37. Henriks-Eckerman ML, Suuronen K, Jolanki R, Alanko K. Methacrylates in dental restorative materials. Contact Dermatitis. 2004;50:233-7.

38. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. J Dent. 2000;28:61-7.

39. 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;74:1162-7.

40. Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The in vitro cytotoxicity of eluates from dentin bonding resins and their effect on tyrosine phosphorylation of L929 cells. Dent Mater. 2001;17:333-9.

41. Kenshima S, Francci C, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE. Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. J Dent. 2006;34:775-83.

42. Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, kleinjung T, Flowaczny M, Hickel R et al. Genotoxicity and citotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. J Dent. 2004;32:229-34.

43. 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.

44. Mantellini MG, Botero PY, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. J Dent Res. 2003;82:592-6.

45. Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systemic review. Dent Mater. 2005;21:895-910.

46. Nunes TG, Garcia FCP, Osorio R, Carvalho R, Toledano M. Polymerization efficacy of simplified adhesive systems studied by NMR and MRI techniques. Dent Mater. 2006;22:963-72.

47. Oliveira SSA, Marshall SJ, Habelitz S, Gansky SA, Wilson RS, Marshall Jr GW. The effect of a self-etching primer on the continuous demineralization of dentin. Eur J Oral Sci. 2004;112:376-83.

48. Outhwaite WC, McKenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. J Dent Res. 1974;53:1503.

49. Parajpe A, Bordador LCF, Wang M-Y, Hume WR, Jewett A. Resin monomer 2-hydroxyethyl metacrilate (HEMA) is a potent inducer of apoptotic cell death in human and mouse cells. J Dent Res. 2005;84:172-7.

50. Pashley DH. The influence of dentin permeability and pulp blood flow on pulpal solute concentrations. J Endod. 1979;5:355-61.

51. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. J Dent Res. 1985;64:613-20.

52. Pashley DH. Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. Int Endod J. 1988;21:143-54.

53. Pashley DH. Dentine permeability: theory and practice. In: Spangberg LSW, editor. Experimental endodontics. Boca Raton:CRC Press. 1989:19-49.

54. Pashley DH, Matthews WG. The effects of outward forced convective flow on inward diffusion of human dentine in vitro. Arch Oral Biol. 1993;38:577-82.

55. Pashley DH, Michelich V, Kehl T. Dentin permeability: effects of smear layer removal. J Prost Dent. 1981;46:531-7.

56. Pashley DH, Livingston MJ, Reeder OW, Horner J. Effects of the degree of tubule occlusion on the permeability of human dentine in vitro. Arch Oral Biol. 1978;23:1127-33.

57. Pashley DH, Kepler EE, Williams EC, Osake A. The effects of acid etching on the in vivo permeability of dentin in the dog. Arch Oral Biol. 1983;28:555-9.

58. Pashley EL, Tao L, Pashley DH. Sterilization of human teeth: its effect on permeability and bond strength. Am J Dent. 1993;6:189-91.

59. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res. 1995;74:1602-6.

60. Reeder OW, Walton RE, Livingston MJ, Pashley DH. Dentine permeability: determinants of hydraulic conductance. J Dent Res. 1978;57:187-93.

61. Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-Kinases p38, JNK and ERK. Dent Mater. 2007;23:34-9.

62. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. J Endod. 2002;28:188-92.

63. Snuggs HM, Cox CF, Powell CF, White KC. Pulp healing and dentinal bridge formation in an acidic enviroment. Quintessence Int. 1993;24:501-10.

64. Spagnuolo G, D'Antò V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acethyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. Biomaterials. 2006;27:1803-9.

65. Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H et al. NF-B protection against apoptosis induced by HEMA. J Dent Res. 2004;83:703-7.

66. Spahl W, Budzikiewics H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. J Dent. 1998;26:137-46.

67. 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 pappilae, MDPC-23. Connect Tissue Res. 1998;37:251-61.

68. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. Dent Mater. 2001;17:296-308.

69. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? Can Dent Assoc. 2003;69:726-31.

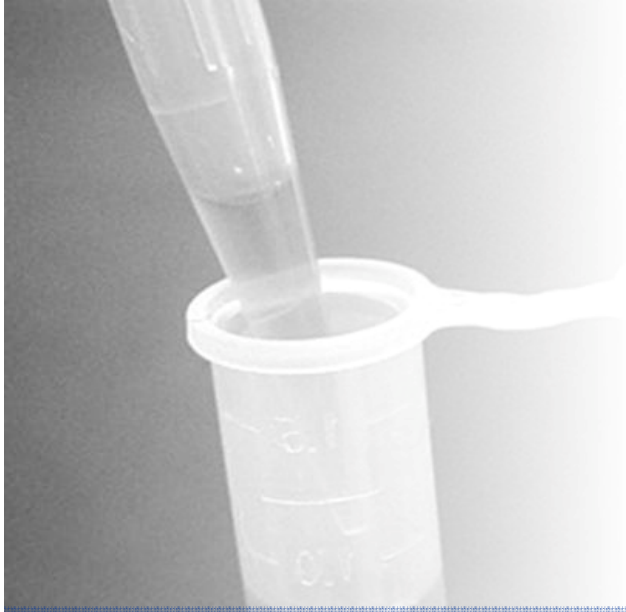
70. Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J, Costa CAS. In vivo evaluation of the biocompatibility of three current bonding agents. J Oral Rehab. 2006;33:542-50.

71. Vajrabhaya L; Pasasuk A; Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. Oper Dent. 2003;28:440-4.

72. Volk J, Engelman J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin momomers on the cellular glutathione concentratin of cultured human gingival fobroblasts. Dent Mater. 2006;22:499-505.

73. Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC. Cytotoxicity of components of resin and other dental restorative materials. J Oral Rehabil. 1994;21:453-62.

74. Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. J Biomed Mater Res. 1997;37:517-24.



ANEXOS

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, ..., portador do documento de RG número ....., participarei voluntariamente na pesquisa intitulada **Difusão transdentinária e citotoxicidade de sistemas adesivos autocondicionantes**, tendo como pesquisadora responsável a Pós-graduanda Célia Regina Moreira Lanza, e dou consentimento para doação do (s) dente (s) terceiro molar (es), que será extraído na clínica do Dr. Adriano Campos Teixeira uma vez que não há possibilidade de receber tratamento conservador.

Para tanto, tomo ciência que:

1. A pesquisa tem o objetivo de testar materiais que tem capacidade de se aderir à superfície do dente. Os dentes serão utilizados após sua remoção, não tendo risco de haver contaminação para o paciente.
2. Tenho total autonomia para retirar meu consentimento a qualquer momento, bem como tenho total liberdade de solicitar esclarecimentos em qualquer momento do desenvolvimento da pesquisa.
3. Os resultados da pesquisa serão exclusivamente para a produção de informações científicas e serão publicados em revista especializada. Porém, a pesquisadora responsável garante sigilo quanto aos dados confidenciais envolvidos e a minha identidade.
4. Estou ciente que a doação do(s) dente(s) será voluntária, não envolvendo nenhuma forma de envolvimento monetário. Portanto, não serei ressarcido dos eventuais gastos que terei para comparecer a consulta agendada para a remoção dos dentes.

Confirmo que recebi de maneira clara todas as informações da pesquisa em questão. Assim, após ter compreendido todos os riscos que por acaso possam ocorrer e os meus direitos, informo que doarei, por livre e espontânea vontade, o(s) dente(s).....

Belo Horizonte, ___/ ___/2004

Paciente_____ Assinatura_____

Testemunha_____ Assinatura_____

Telefones: Comitê de Ética em Pesquisa da FOAR-UNESP: (0xx16)3301-6432

Pesquisadora responsável: (0xx16) 3331-3267 /Dr. Adriano Campos Teixeira (0xx31) 3349-1609

Anexo 2. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"DIFUSÃO TRANSDENTINÁRIA E CITOTOXICIDADE DE SISTEMAS ADESIVOS AUTOCONDICIONANTES"**, sob o protocolo nº 65/04 e o relatório final de responsabilidade do Pesquisador (a) *CELIA REGINA MOREIRA LANZA*, estão de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa–FOAr.

Certify that the research project titled **"TRANSDENTINAL DIFFUSION AND CYTOTOXICITY OF SELF-ETCHING ADHESIVE SYSTEMS"**, protocol number 65/04, and final technical report, under Dr *CELIA REGINA MOREIRA LANZA*, responsability, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has beem aproved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP.

Araraquara, 21 de março de 2007.

Profª Drª Múrian Aparecida Onofre
Coordenadora

Anexo 3. Análise da variável CONDUTÂNCIA HIDRÁULICA

Tabela 3A. Testes de normalidade aplicados aos grupos individualmente

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	grupo	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
permeabilidade	Clearfil SE Bond	.249	8	.153	.794	8	.032
	Clearfil Protect Bond	.268	8	.096	.799	8	.036
	Adper Prompt	.264	8	.108	.865	8	.171
	Xeno III	.246	8	.168	.895	8	.315
	Single Bond	.282	8	.060	.870	8	.192
	Tampão-fosfato	.230	8	.200*	.836	8	.077

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabela 3B. Teste de normalidade aplicado ao conjunto completo de dados

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
permeabilidade	.229	48	.000	.837	48	.010**

**. This is an upper bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

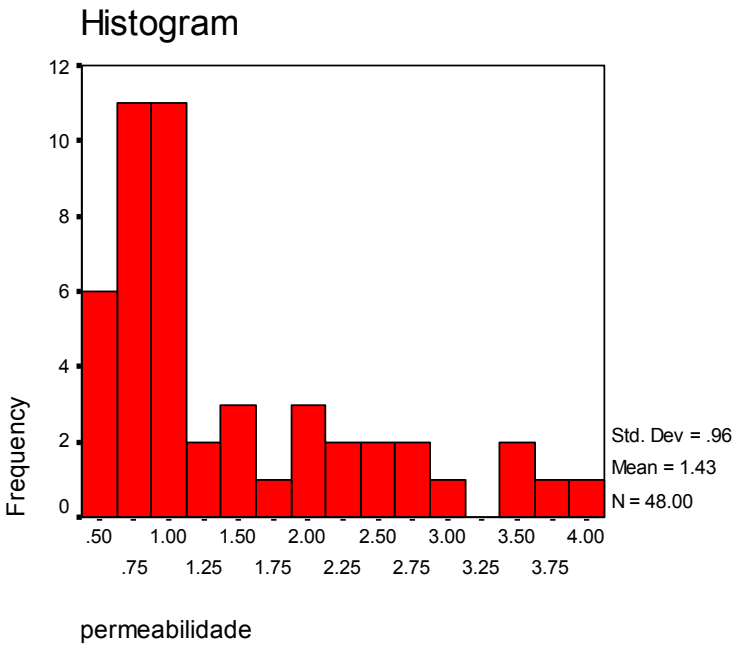


FIGURA 3A - Frequência de distribuição dos dados de condutância hidráulica

Tabela 3C. Postos médios dos valores de condutância hidráulica segundo os grupos.

Ranks

	grupo	N	Mean Rank
permeabilidade	Clearfil SE Bond	8	24.88
	Clearfil Protect Bond	8	24.13
	Adper Prompt	8	25.25
	Xeno III	8	25.00
	Single Bond	8	23.50
	Tampão-fosfato	8	24.25
	Total	48	

Tabela 3D. Teste estatístico de Kruskal-Wallis aplicado aos dados de condutância hidráulica

Test Statistics[a,b]

	permeabilidade
Chi-Square	.088
df	5
Asymp. Sig.	1.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupo

Anexo 4. Cronogramas padrões

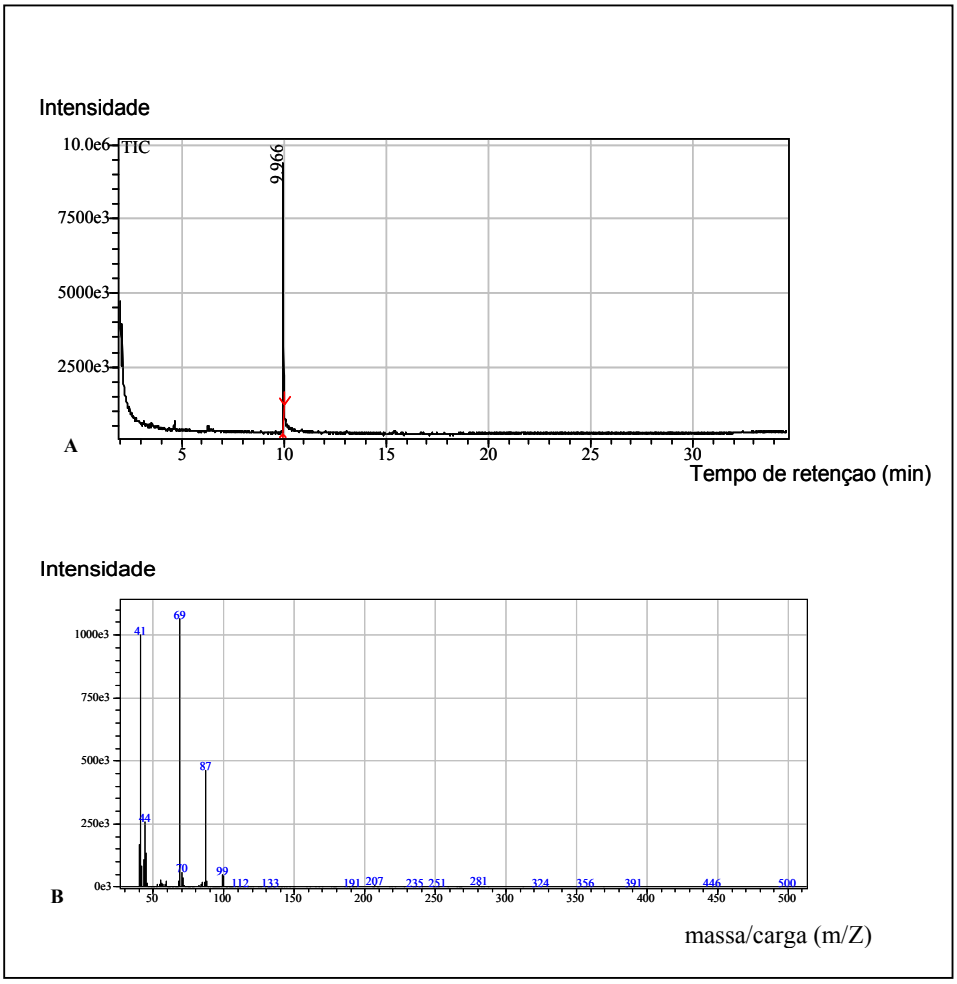


FIGURA 4.1 - A. Cromatograma do padrão autêntico do HEMA; B. espectro de massas do HEMA, injetado nas mesmas condições de análises.

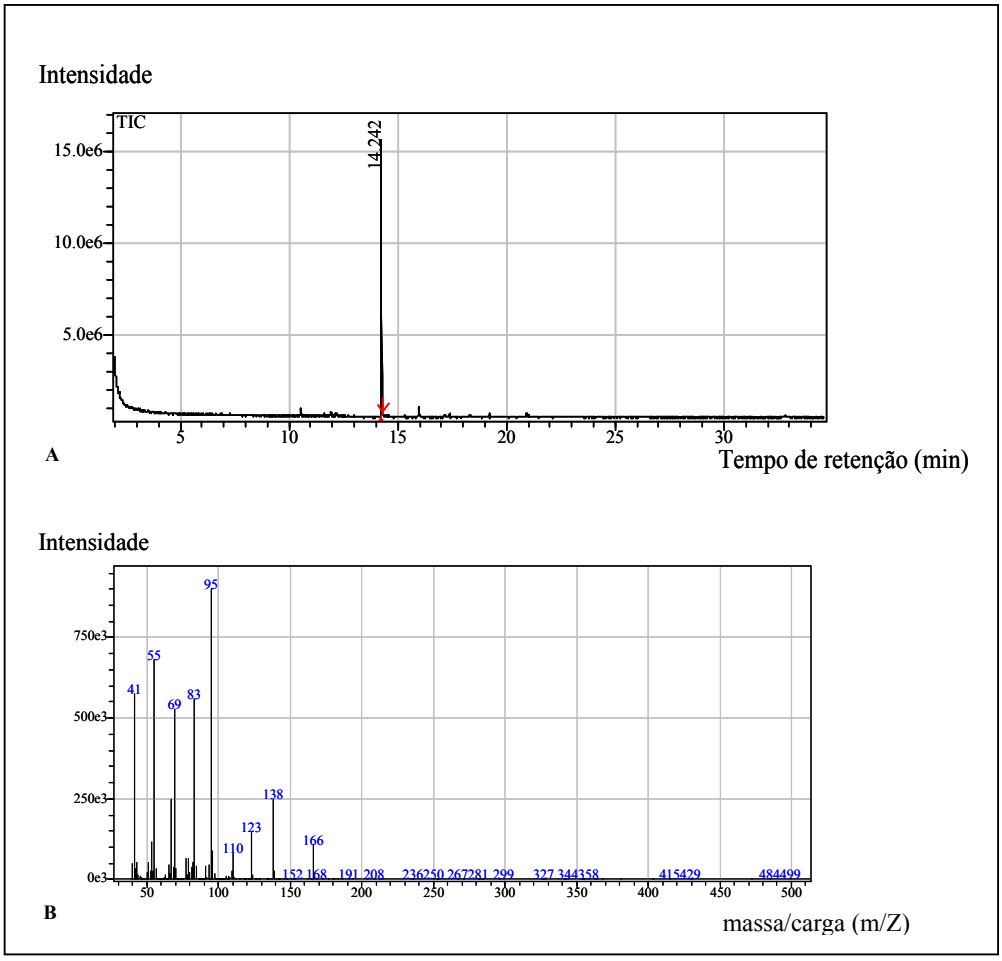


FIGURA 4.2 - A. Cromatograma do padrão autêntico da canforoquinona; B. espectro de massas, injetado nas mesmas condições de análises.

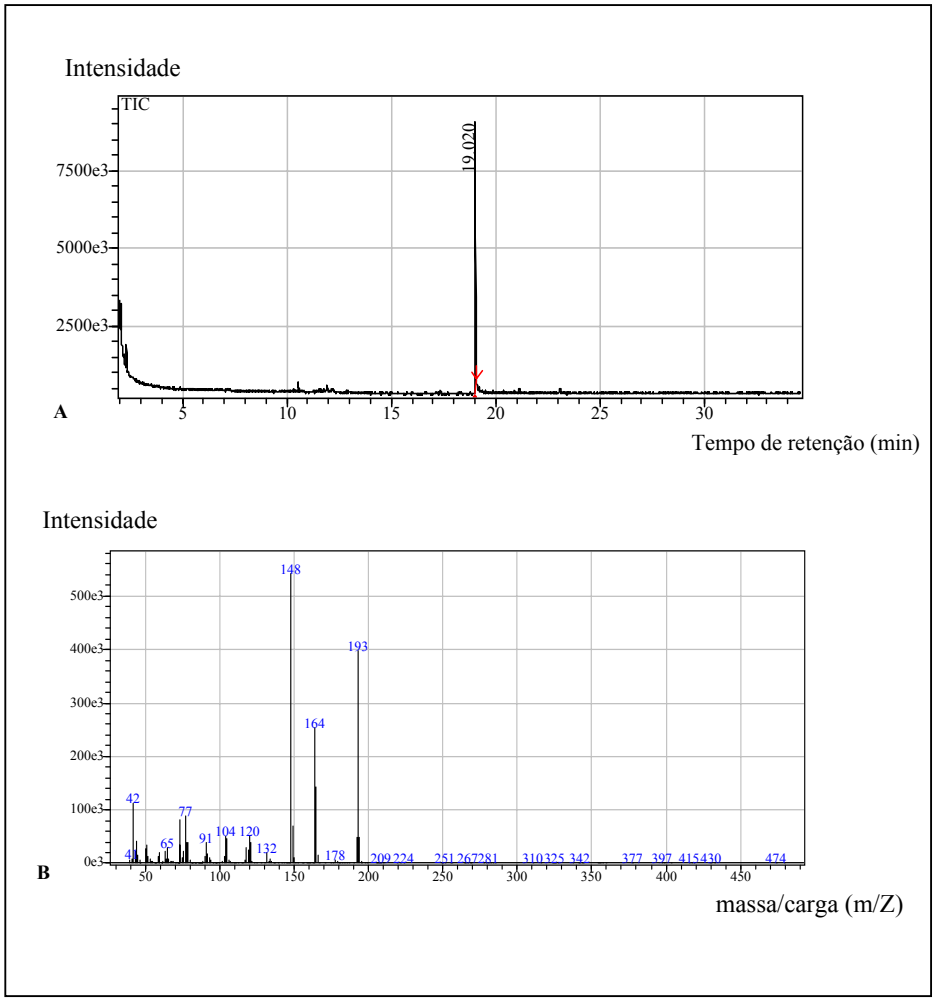


FIGURA 4.3 - A. Cromatograma do padrão autêntico do fotoiniciador DMPT; B. espectro de massas, injetado as mesmas condições de análises.

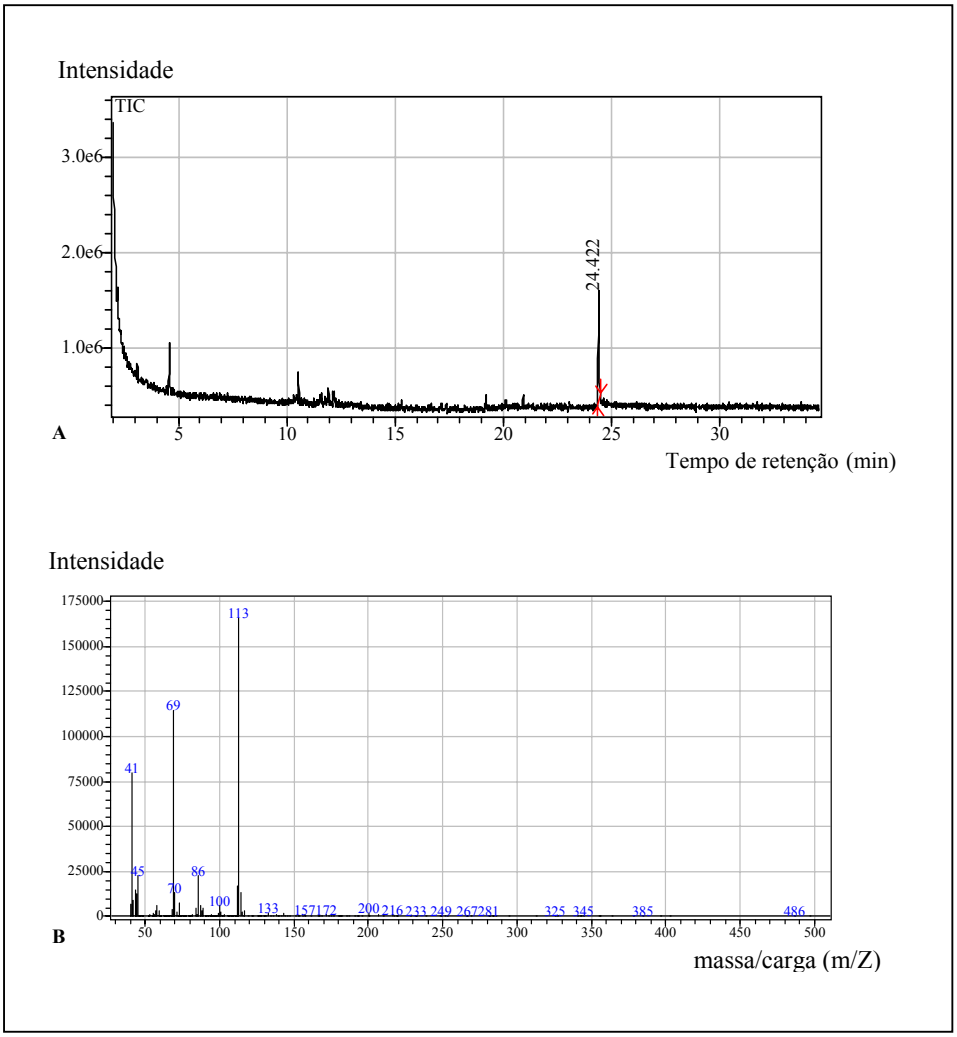


FIGURA 4.4 - A. Cromatograma do padrão autêntico do monômero TEGDMA; B. espectro de massas, injetado nas mesmas condições de análise.

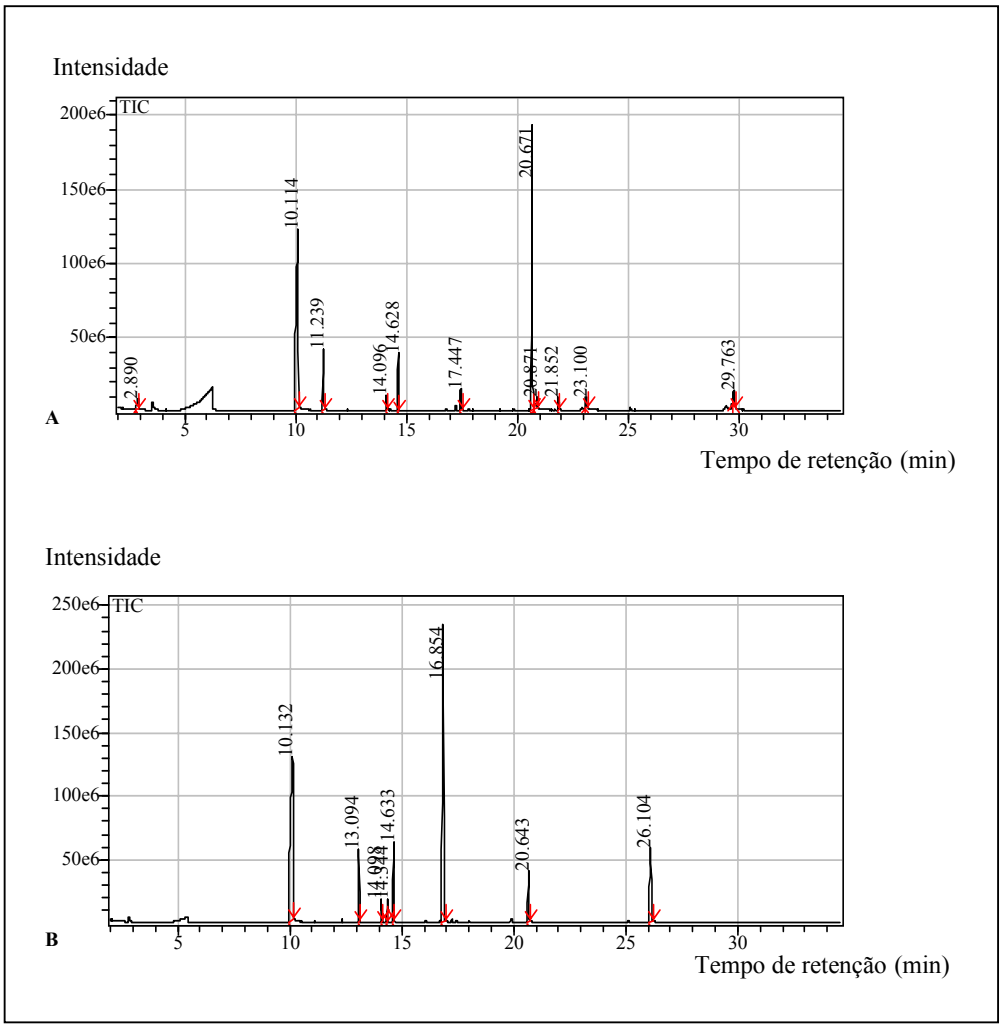


FIGURA 4.5 - Cromatograma padrão do sistema adesivo Clearfil Protect Bond. A. primer; B.bond, injetados isoladamente nas mesmas condições de análise.

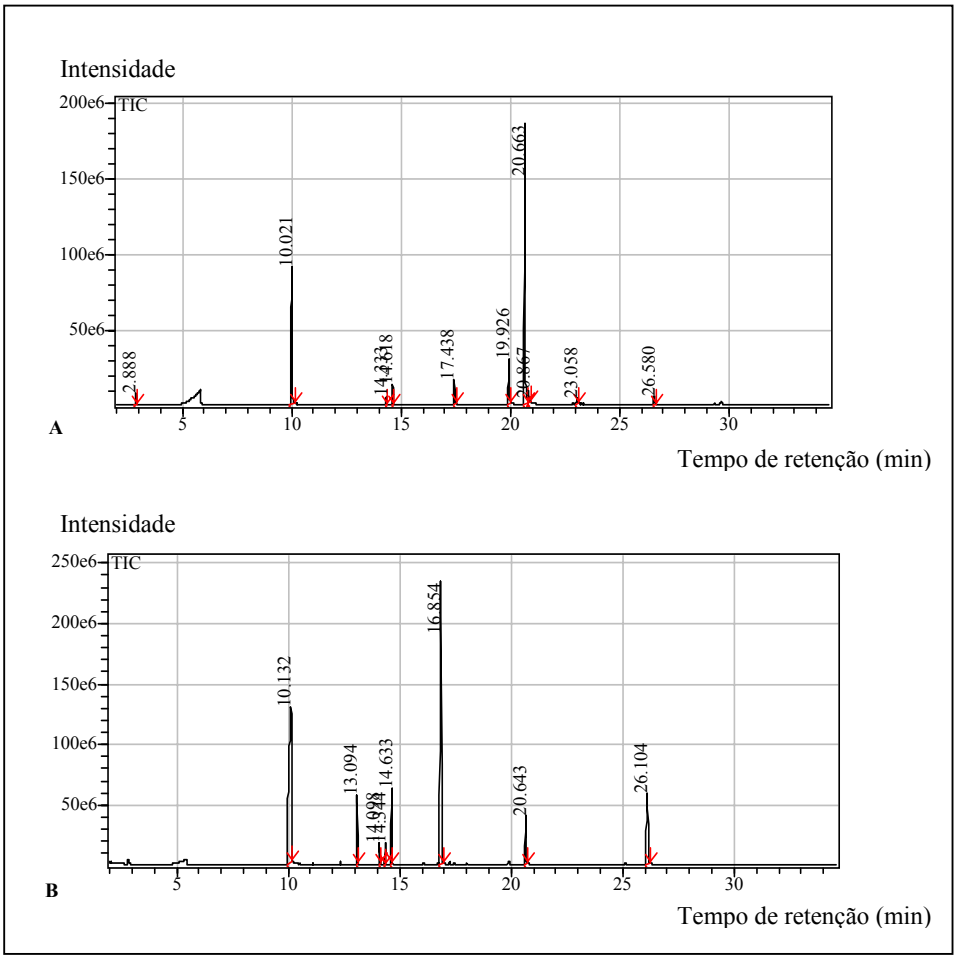


FIGURA 4.6 - Cromatograma padrão do sistema adesivo Clearfil SE Bond. A. primer; B.bond, injetados isoladamente nas mesmas condições de análise.

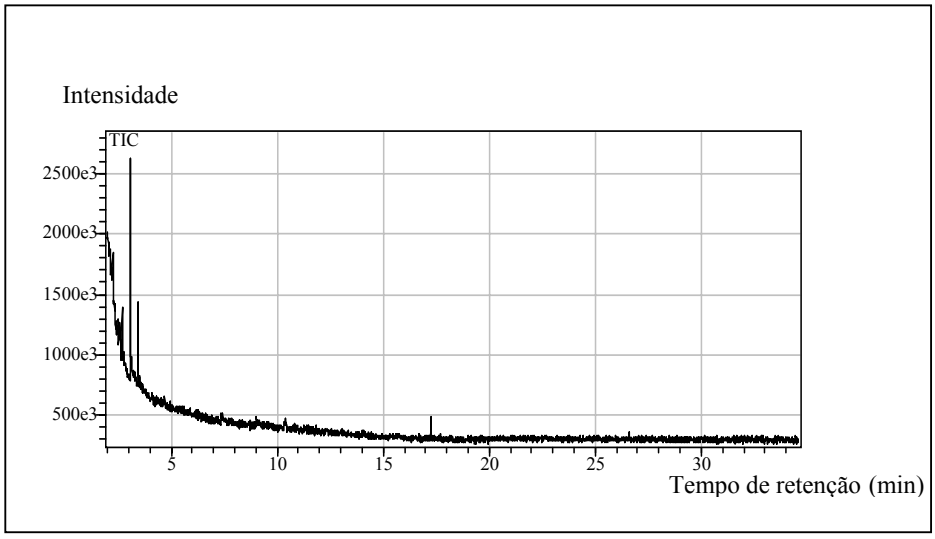


FIGURA 4.7 - Cromatograma padrão do meio de cultura (DMEM) utilizado nas amostras, injetado nas mesmas condições de análise.

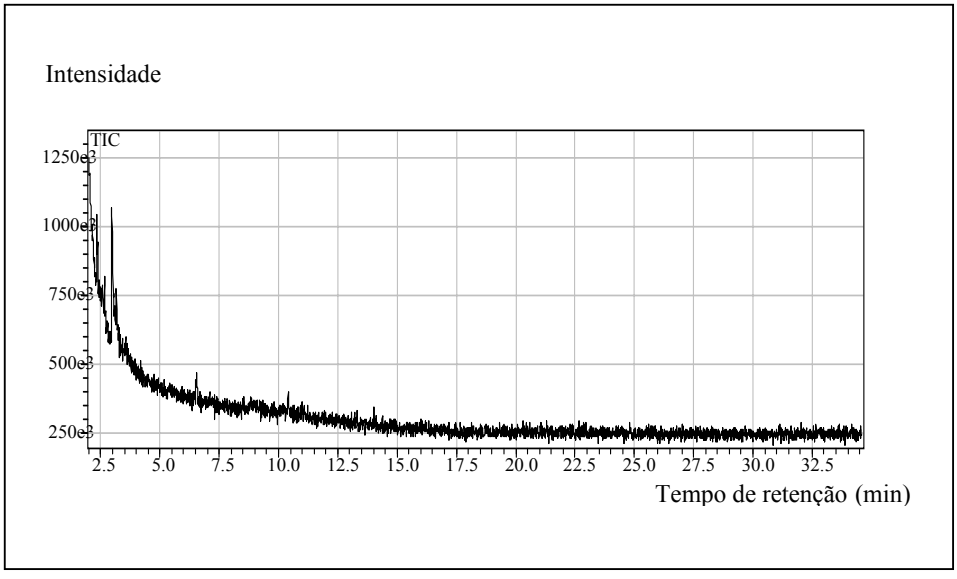


FIGURA 4.8 - Cromatograma do grupo controle (tampão fosfato), injetado nas mesmas condições de análise.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 06 de Agosto de 2007.

CÉLIA REGINA MOREIRA LANZA

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo