

## CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E POTENCIAL INIBITÓRIO DA MMP-2 POR MONÔMEROS METACRILATOS APLICÁVEIS NA ODONTOLOGIA RESTAURADORA ADESIVA

**SELAYARAN, Maicon dos Santos<sup>1</sup>; TORRE, Eliana do Nascimento<sup>2</sup>; ETGES, Adriana<sup>3</sup>; LEITE, Fábio Renato Manzolli<sup>4</sup>; CARVALHO, Rodrigo Varela de<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Acadêmico de Graduação, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia.

<sup>2</sup> Acadêmica de Doutorado, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia.

<sup>3</sup> Professora Doutora Associada, área de Patologia Bucal e Estomatologia, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Departamento de Semiologia e Clínica, ([aetges@gmail.com](mailto:aetges@gmail.com)).

<sup>4</sup> Professor Doutor, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia.

<sup>5</sup> Professor Doutor, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia.

[R&M1] Comentário: Professora, veja se estes dados em vermelho estão corretos...

### 1 INTRODUÇÃO

As fibras colágenas da dentina, juntamente com os adesivos dentinários, são responsáveis pela formação da camada híbrida que é a responsável pela adesão da restauração ao dente. A falha de restaurações adesivas pode ser causada pela degradação hidrolítica do adesivo ou pela degradação enzimática do colágeno pela MMP-2, uma enzima proteolítica presente em abundância na dentina (DE MUNK et al., 2005; CARRILHO et al., 2007).

A MMP-2 é sintetizada pelos odontoblastos e após a mineralização da dentina, essa enzima fica presa na estrutura dental, podendo ser liberada durante o condicionamento ácido de um procedimento restaurador (TJADERHANE et al., 1998; MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; DAYAN et al., 1983; CARRILHO et al., 2007). Estudos têm mostrado que o gluconato de clorexidina possui a capacidade de inibir a MMP-2. Foi constatado também que monômeros HEMA, TEGMA e Metacrilato de Zinco foram capazes de inibir a ação da MMP-2 (HEBLING et al., 2005; PASHLEY et al., 2004; GENDRON et al., 1999; CARVALHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; HENN et al., 2011).

Entretanto, além do potencial inibitório de MMP-2, os materiais testados devem ser biologicamente compatíveis, a fim de poderem ser usados clinicamente. Para isso, faz-se necessário a investigação da citotoxicidade e genotoxicidade desses materiais.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

Terceiros molares doados após extração foram cortados em fatias de 1mm, estas foram moídas manualmente em gral de cerâmica a fim de se obter o pó de dentina de onde se fez a extração das MMP-2. O teste de zimografia, no qual uma corrente elétrica passa pelo sistema contendo um gel de poliacrilamida com o extrato de dentina, serve para evidenciar as MMP-2 em bandas de acordo com o peso molecular. Após, o gel de poliacrilamida contendo as MMP-2 é colocado em contato com os 5 tipos de monômeros usados neste estudo a fim de constatar se houve inibição da MMP-2.

Foram feitos os cultivos celulares das linhagens 3T3 e FPH para posterior realização dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade (FRESHNEY, 2000).

Na sequência, foi avaliado a citotoxicidade desses monômeros através do teste de viabilidade celular (em células 3T3 e FPH) o qual através da reação entre a

enzima desidrogenase succínica da respiração celular com o reagente MTT indica se houve morte celular ou não.

Foi avaliado também o potencial genotóxico dos monômeros através do teste da frequência de micronúcleos, tal teste verifica se a substância em contato com as células (3T3 e FPH) foi capaz de provocar estresse ao núcleo celular ao ponto de induzir mitoses atípicas com formação de micronúcleos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Zimografia

Os ensaios de zimografia foram feitos em duplicata e a MMP que foi expressada no gel de poliacrilamida foi a MMP-2, apresentando massa molecular de aproximadamente 62 KDa e sendo inibida por EDTA e não por NEM, o que caracteriza como metaloproteinase da matriz extra celular.

##### 3.1.1 Análise descritiva das inibições de cada experimento, em relação ao controle:

**PEG400DMA** teve intermediária inibição em todas as concentrações, em torno de 58 %;

**PEG200DMA** somente foi inibitório na concentração de 5mM, em torno de 63%;

**T4GDMA** teve potencial inibitório em torno de 60% nas concentrações de 5mM, 0,01mM e 0,001mM. A concentração de 1mM inibiu em torno de 70% e em 0,1mM não houve inibição.

**TEGDMA** todas as concentrações tiveram um pequeno potencial inibitório, de 58% a 46%, mas 5mM foi a de maior inibição, em torno de 65% .

**EGDMA** todas as concentrações inibiram parcialmente em torno de 50%, exceto 1mM, que foi inibitória em 70% e 0,1mM que inibiu 68%.

#### 3.2 Citotoxicidade

Os ensaios foram realizados em triplicata e a análise estatística dos dados foi feita por ANOVA e Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A concentração de 10mM de todos os monômeros usados no teste causou a morte de 100% das células (3T3 e FPH).

Nas células FPH, comparando-se os dados do grupo controle (não tratado), observou-se com significativa diferença estatística que os monômeros foram mais citotóxicos nos grupos TEGDMA (concentração 1mM e 0,01mM), grupo T4GDMA (concentrações 0,1mM e 0,01mM), grupo PEG 200 DMA e PEG 400 DMA.

Nas células 3T3, os resultados do monômero EGDMA foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle. Observou-se uma maior citotoxicidade do grupo TEGDMA (concentrações 1mM, 0,1mM, 0,01mM), grupo T4DMA (concentrações 1mM, 0,1mM e 0,001mM), grupo PEG 200 DMA (1mM e 0,01mM) e PEG 400 DMA (1mM, 0,01mM e 0,001mM) em relação ao grupo controle.

#### 3.3 Genotoxicidade

A contagem das células foi realizada por 3 avaliadores cegos e a estatística foi feita por ANOVA e Tukey. A contagem da frequência de micronúcleos seguiu os critérios adotados por Countryman & Heddle (1976).

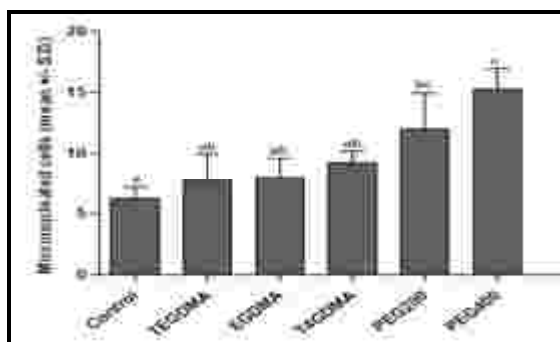


Gráfico 1: Comparação da quantidade de células micro nucleadas do controle (não tratado) com a quantidade de células MN, após a exposição de 24hs de cada monômero usado neste estudo nas células 3T3.

Houve diferença estatística entre os grupos PEG 200 e PEG 400 quando comparados com o controle. Já os monômeros EGDMA, TEGDMA e T4GDMA não tiveram diferença estatística entre si, nem entre eles e o controle, mas foram estatisticamente diferentes do monômero de maior peso molecular, o PEG 400, e semelhantes ao PEG 200. E por fim, este (PEG 200) e o PEG 400 não tiveram diferenças estatísticas.

#### 4 CONCLUSÃO

Com os resultados do respectivo estudo pode-se concluir que o peso molecular dos monômeros está diretamente relacionado com o potencial inibitório de MMP-2, sendo mais inibitórios os monômeros de maior peso molecular. A citotoxicidade e a genotoxicidade também se apresentaram maiores quando utilizados monômeros de maior peso molecular. Tendo-se em vista a importância que a inibição das MMPs representaria para o desenvolvimento de sistemas adesivos odontológicos mais duradouros e confiáveis, torna-se conveniente a realização de mais pesquisas envolvendo o assunto.

#### 5 REFERÊNCIAS

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v.86, n.6, p.529-33, 2007.

CARVALHO RV, OGLIARI FA, DE SOUZA AP, SILVA AF, PETZHOLD CL, LINE SR, PIVA E, ETGES A. 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. **Eur J Oral Sci** 117:64-7, 2009.

CARVALHO RV, OGLIARI FA, MARQUES MR, DE SOUZA AP, PETZHOLD CL, LINE SR, PIVA E, ETGES A. Inhibition of the activity of matrix metalloproteinase 2 by triethylene glycol dimethacrylate. **Clin Oral Investig** 10, 2010.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat Res**, v.41, n.2-3, p.321-32, 1976.

DAYAN D, BINDERMAN I, MECHANIC GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. **Archives of Oral Biology**, v.28, p.185-7, 1983.

DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEM, M.; VAN MEERBEEK, B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **J Dent Res**, v.84, n.2, p.118-32, 2005.

FRESHNEY RI. **Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique** (4th Edition). Wiley Liss, Hoboken, NJ, USA, 319, 2000.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.6, n.3, p.437-9, 1999.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **Journal of Dental Research**, v.84, n.8, p.741-6, 2005.

HENN S, DE CARVALHO RV, OGLIARI FA, DE SOUZA AP, LINE SR, DA SILVA AF, DEMARCO FF, ETGES A, PIVA E. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. **Clinical Oral Investigations**, v.Mar 30, 2011.

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Arch Oral Biol**, v.45, n.9, p.757-65, 2000.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; ITO, S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **Journal of Dental Research**, v.83, n.3, p.216-21, 2004.

TJADERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v.77, n.8, p.1622-9, 1998.