

AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE UM CIMENTO EXPERIMENTAL PARA CAPEAMENTO PULPAR

**CHISINI, Luiz Alexandre¹; DANTAS, Raquel Venâncio Fernandes¹; CONDE,
Marcus Cristian Muniz¹; ZANCHI, Cesar Henrique¹; DEMARCO Flávio
Fernando²**

¹Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Pelotas; ²Faculdade de Odontologia,
Departamento de Odontologia Restauradora. ffdemarco@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A polpa é, basicamente, um tecido conjuntivo especializado que têm como atributos a nutrição e defesa da estrutura dental a partir de seu rico plexo vasculonervoso (Demarco, Conde et al. 2011). Este tecido tem por função primordial a formação de dentina, evento que se inicia a partir da diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos, os quais irão iniciar a secreção de uma matriz rica em colágeno. Esta matriz secretada irá sofrer um processo de mineralização que irá originar a dentina, um tecido mineralizado formado por uma estrutura tubular na qual se alojam os prolongamentos das células odontoblásticas (Bjorndal and Mjor 2001). Devido a íntima relação entre a polpa e a dentina, o conjunto formado por estes dois tecidos é chamado de complexo dentino-pulpar (CDP). Enquanto a polpa é biologicamente ativa, este processo é um evento fisiológico e contínuo (Linde and Goldberg 1993). Entretanto, o CDP é constantemente submetido a agressões como traumas, calor e toxinas microbianas. Em razão disso as células do CDP possuem uma capacidade limitada de regeneração (Demarco, Conde et al. 2011). Quando o CDP é submetido a agressões de baixa intensidade, que não excedem a capacidade de resposta da polpa, mais precisamente dos odontoblastos, há uma sinalização biológica para que estas células iniciem a produção de dentina reacional. Já, quando o CDP é submetido a injúrias que proporcionam a destruição dos odontoblastos (Bjorndal and Mjor 2001) há uma sinalização para que as células progenitoras, presentes no tecido pulpar, migrem para o sítio da injúria (Demarco et al., 2011) (Demarco, Conde et al. 2011) se diferenciem e então iniciem a secreção de dentina reparadora (Tecles, Laurent et al. 2005).

O tratamento pulpar conservador consiste na aplicação de uma ou mais camadas de materiais, em casos de exposição ou iminente exposição pulpar (Modena, Casas-Apayco et al. 2009). Este tratamento tem por objetivo tratar injúrias reversíveis e manter a vitalidade e a função da polpa dentária (Modena, Casas-Apayco et al. 2009) e pode ser realizado de duas maneiras: capeamento pulpar indireto, em cavidades profundas sem exposição pulpar; ou capeamento pulpar direto para pequenas exposições mecânicas ou traumáticas, quando há uma condição de resposta favorável (Tuna and Olmez 2008). Por muitos anos, o hidróxido de cálcio (HC) foi o material de primeira escolha para estas terapias. O HC é capaz de iniciar a cascata de reparo do tecido pulpar estimulando a formação de dentina terciária devido ao seu pH altamente alcalino (Parirokh and Torabinejad 2010). Atualmente, em casos de capeamento pulpar direto o material de primeira escolha tem sido o cimento mineral trióxido agregado ou MTA (Parirokh and Torabinejad 2010). Seus benefícios sobre o HC incluem diminuição da inflamação, hiperemia e necrose dos tecidos pulpares, além disto, reforça a formação da ponte de dentina (Parirokh and Torabinejad 2010). A combinação de materiais, necessária para a realização do capeamento direto pode gerar, ao longo do tempo, falhas devido à existência de várias interfaces entre os materiais (Weiner 2002). Um dos materiais empregados

juntamente com o MTA é cimento de ionômero de vidro (CIV), um material que possui a capacidade de se unir quimicamente aos tecidos dentários mineralizados. Além disso, possui capacidade de liberar flúor e seu coeficiente de expansão térmica é semelhante ao da dentina (Weiner 2002).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade em cultivo celular de um cimento híbrido, a base de MTA e CIV, destinado ao capeamento pulpar direto e indireto.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A formulação do material avaliado foi desenvolvida segundo a composição dos produtos apresentados abaixo:

- MTA Branco (Referência Comercial): Bi_2O_3 , CaO , SiO_2 , Al_2O_3 ;
- CIV Convencional - **Líquido**: copolímeros de ácidos policarboxílico, maleico, itacônico, tartárico e água purificada; **Pó**: cristais de fluoraluminossilicato radiopaco, ácido policarboxílico e pigmentos.
- MTA Experimental - **Líquido**: H_2O + líquido do CIV; **Pó**: Pó CIV + Pó MTA Branco

Cultivo Celular: Fibroblastos 3T3 de camundongos foram cultivados em Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. Uma garrafa de cultivo foi incubada em uma estufa de CO_2 com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C , 95% de ar e 5% de CO_2 . Quando as células atingiram a subconfluência (80%), foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) removendo os metabólitos celulares. Depois disso, foi usada tripsina por 5 minutos para destacar as células da garrafa, e para inativá-la foi usada uma mistura de meio DMEM+SFB, de no mínimo o mesmo volume de tripsina. Em um tubo de 15 mL colocou-se o conteúdo da garrafa para então ser levado para centrifugação, por 5 minutos, sob a rotação de 1000 rpm, ocorrendo assim a precipitação do conteúdo celular no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 5 mL de meio DMEM a 10% de SFB, após a homogeneização, foi retirado 20 μL para a contagem das células em Câmara de Neubauer. Após a contagem, foram semeadas 2×10^4 células por poço da placa de 96 poços. Então, a placa foi levada a estufa por 24h para a adesão das células.

Com a utilização de uma matriz metálica circular (5 mm x 2 mm) foram confeccionados corpos de prova (CPs) dos materiais acima descritos. Os CPs foram imersos em 1 mL de DMEM+SFB e incubados em estufa (37°C , 5% de CO_2) por 24h para confecção de um eludato correspondente a cada material.

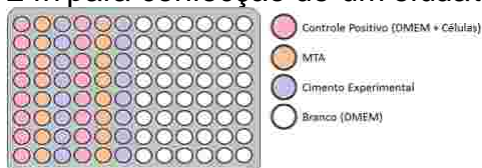


Figura 1. Demonstração da forma de divisão dos grupos na placa de 96 poços. Análise realizada em duplicata

Avaliação da Citotoxicidade: após o período de incubação de 24h, o DMEM foi removido da placa e 200 μL do eludato de cada produto foi adicionado aos poços testes (n=16). A distribuição dos grupos, na placa de 96 poços, foi realizada de acordo com a Figura 1. Após a aplicação do eludato, a placa incubada (37°C , 5% de CO_2) por 24h, para permitir que os produtos atuassem na monocamada celular. Após, a citotoxicidade foi avaliada através de um teste colorimétrico (MTT 5 mg/mL de DMEM). O MTT ficou em contato com as células por 4 horas, em estufa de CO_2 , para permitir a redução do sal pela mitocôndria das células viáveis. Após o período, o meio foi sugado e o formazan ressuspenso e 200 μL de dimetil sulfoxido (DMSO).

O DMSO ficou em contato com as células por 15 minutos e em seguida a placa foi colocada por mais 5 minutos em um agitador (150 rpm).

Os resultados foram avaliados por meio de espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA, em um comprimento de onda de 540 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular.

Análise estatística: os valores médios de absorbância foram calculados analisados através do método ANOVA 1-fator e teste complementar de Tukey (post hoc) com nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio com MTT é considerado o método padrão para determinar a citotoxicidade de materiais dentários em culturas celulares. Uma forma de disponibilizar o material para a execução da reação é o eludato, no qual se obtém, através da solubilização, as substâncias tóxicas do material que potencialmente inibem a atividade e o crescimento celular (Alanezi, Jiang et al. 2010). A partir das análises estatísticas dos resultados do ensaio do MTT, pudemos observar que o cimento experimental obteve resposta semelhante ao MTA convencional, ou seja, a combinação de ácidos presentes no CIV incorporado ao MTA não interferiram inicialmente na citotoxicidade do material quando o experimento foi realizado nos fibroblastos 3T3. Na análise da Figura 2, pudemos ilustrar que o cimento experimental, foi estatisticamente semelhante ao MTA branco e ao grupo controle.

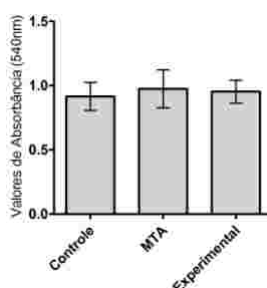


Figura 2. Gráfico de barras demonstrando a citotoxicidade dos materiais testados. É possível observar o material experimental, assim como a referência comercial, não foram estatisticamente ($p > 0,05$) diferentes do controle positivo

O MTA convencional é um material estabelecido no mercado odontológico. É bioativo, biocompatível, conduz e induz a formação de tecido mineralizado. Entretanto, as propriedades físicas do MTA podem ser influenciadas por diversos fatores como, o método de manipulação, pressão de condensação e o tempo de manipulação (Parirokh and Torabinejad 2010). Além disso, possui insignificantes propriedades mecânicas e a alta solubilidade nos fluidos corporais. Com a produção de um cimento híbrido (MTA+CIV), pretendemos aperfeiçoar estas desvantagens inerentes ao MTA. O CIV é um material amplamente utilizado nas terapias pulpares como agente para base (de restaurações de resina composta), ou seja, um protetor do MTA colocado em contato direto com a polpa (Weiner 2002). Esta aplicabilidade se dá por sua capacidade de selamento marginal (adesão aos tecidos dentários) e também por sua capacidade de liberação de flúor. Outra propriedade relevante do CIV é ter o coeficiente de expansão térmica e módulo de elasticidade, muito próximos aos da estrutura dental (Modena et al., 2009) (Modena, Casas-Apayco et al. 2009). Com os novos conceitos de simplificação do procedimento restaurador e de adesividade, deseja-se atualmente a diminuição de interfaces entre materiais para restaurar a cavidade sem prejudicar as características biológicas do dente (Weiner 2002). A confecção de um material com capacidade de agregar as propriedades biológicas do MTA, às propriedades mecânicas e químicas (adesividade e liberação de Flúor) do CIV poderá proporcionar um único material. Este será um material de base para restaurações com a capacidade de estimular o reparo de polpa expostas.

Desta forma uma técnica mais simples para terapias pulpares será desenvolvida eliminando assim uma zona suscetível a falhas na restauração, a interface entre materiais.

4. CONCLUSÃO

Apesar da presença de ácidos provenientes do CIV, o cimento híbrido experimental demonstrou não ser citotóxico quando em contato com células originárias de tecido conjuntivo. Ensaio como resistência a tração diametral e sorção e solubilidade são testes frequentemente empregados para a avaliação mecânica e física de materiais odontológicos e também devem ser realizados. Além disso, estudos do efeito deste cimento em cobaias podem dar respostas mais próximas das obtidas nos humanos.

5 REFERÊNCIAS

- | ALANEZI, A. Z.; JIANG, J. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. 122-125, 2010.
- | BJORN DAL, L.; MJOR, I. A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence Int**, v. 32, n. 9, p. 717-736, 2001.
- | DEMARCO, F. F.; CONDE, M. C.; CAVALCANTI, B. N.; CASAGRANDE, L.; SAKAI, V. T.; NÖR, J. E. Dental pulp tissue engineering. **Braz Dent J** v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.
- | MODENA, K. C.; CASAS-APAYCO, L. C. et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **J Appl Oral Sci**, v. 17, n. 6, p. 544-554, 2009.
- | PARIROKH, M; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J Endod**, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010.
- | PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. **J Endod**, v. 36, n. 3, p. 400-413, 2010.
- | TECLES, O.; LAURENT, P. et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. **Arch Oral Biol**, v. 50, n. 2, p. 103-108, 2005.
- | TUNA, D; OLMEZ A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. **Int Endod J**, v. 41, n. 4, p. 273-278, 2008.
- | WEINER, R. S. Liners, bases, and cements: a solid foundation. **Gen Dent**, v. 50, n. 5, p. 442-446, 2002.