

CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO RESTAURADORES SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM ODONTOBLÁSTICA

CYTOTOXICITY OF RESTORATIVE GLASS-IONOMER CEMENTS TO AN ODONTOBLAST CELL LINE

Coimbra, Luciana Rocha*
Giro, Elisa Maria Aparecida**
Aranha, Andreza Maria Fábio***
Costa, Carlos Alberto de Souza****

RESUMO

Os efeitos citotóxicos dos cimentos de ionômero de vidro podem ser atribuídos aos componentes liberados por estes materiais. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a citotoxicidade dos extratos de um cimento de ionômero de vidro convencional (Ketac Fil Plus – 3M/ESPE) e de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC – GC) aplicados sobre células da linhagem odontoblástica MDPC-23. Corpos de prova com dimensões padronizadas foram preparados, imersos em 1,1mL de meio de cultura (DMEM), e incubados por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Os extratos obtidos foram filtrados, tiveram o pH ajustado para 7,4 e, foram incubados por 24 horas em contato direto com as células MDPC-23. DMEM puro foi utilizado como controle negativo. O metabolismo celular foi determinado pelo teste do MTT e os valores numéricos obtidos foram submetidos à análise estatística. A morfologia das células em contato com os extratos dos materiais experimentais ou controle (DMEM) foi avaliada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos pelo teste do MTT não mostraram diferença estatística significativa entre os dois materiais e o grupo controle. Na análise em MEV, tanto para os cimentos de ionômero de vidro como para o grupo controle, foi observado um grande número de células com morfologia ligeiramente alongada e com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos. Assim, foi possível concluir que os materiais ionoméricos avaliados apresentam baixo efeito citotóxico para as células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

UNITERMOS: citotoxicidade; odontoblastos; cimentos de ionômero de vidro.

SUMMARY

The cytotoxic effects of glass-ionomer cements (GICs) may be attributed to the compounds released from these biomaterials. Consequently, the aim of this in vitro study was to evaluate the cytotoxicity of the extracts obtained from a conventional glass-ionomer cement (Ketac Fil Plus – 3M/ESPE) and a resin-modified glass-ionomer cement (Fuji II LC – GC) applied to an immortalized odontoblast cell line (MDPC-23). Standardized round-shaped samples were prepared, immersed in 1.1 mL of culture medium (DMEM), and incubated for 24h at 37°C with 5% CO₂ and 95% air. The extracts from the experimental materials were filtered and the final pH values were adjusted to 7.4. These extracts were applied on the MDPC-23 cells and incubated for additional 24 hours. Fresh DMEM was used as the control group. The cell metabolic activity was determined by the MTT assay and the data were submitted to the

* Aluna do Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP Bolsista PIBIC-CNPq.

** Professora Assistente Doutor da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

*** Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, nível Doutorado, área de concentração: Odontopediatria.

**** Professor Livre-docente da Disciplina de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

statistical analysis. Cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The results of the MTT assay determined no statistical difference among the experimental and control groups. In the cell morphology assessment, a number of cells with spindle shape and several cellular processes on their cytoplasmic membrane were showed for all groups. It was concluded that both glass-ionomer cements evaluated present low cytotoxic effects to the MDPC-23 cells.

UNITERMS: cytotoxicity; odontoblasts; glass-ionomer cement.

INTRODUÇÃO

Introduzidos por Wilson et al.²⁹ no ano de 1972, os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) têm sido amplamente utilizados na Odontologia como forradores cavitários, selantes de fissuras e materiais restauradores. A razão para o interesse dos pesquisadores neste cimento deve-se a algumas importantes propriedades inerentes a este tipo de material, tais como efeito cariostático e remineralizador devido à liberação de flúor (Exterkate et al.,¹⁰ 2005) e adesão química ao esmalte e à dentina (Erickson et al.,⁹ 1994). De acordo com Gandolfi et al.¹² (2005), a liberação de flúor depende da degradação do ionômero de vidro causada pelo pH do meio, sendo que em ambientes com baixos valores de pH ocorre uma maior liberação de flúor. Dessa forma, esse material exerce um importante papel naqueles pacientes que apresentam saliva com pH baixo e alto risco à cárie.

De acordo com a sua composição química, os CIVs podem ser classificados como convencionais (CIVCs) ou modificados por resina (CIVMRs). Os CIVCs são caracterizados pela reação química de um pó de flúor-alumínio silicato de vidro com uma solução aquosa de polímeros ácidos. Por outro lado, nos CIVMRs foram incorporados monômeros hidrofílicos, tais como o 2-hidroxi-etil-metacrilato (HEMA) e iniciadores de polimerização, aos componentes dos CIVCs (Wilson,²⁸ 1990). Assim, a presa dos CIVMRs se dá por meio da reação ácido-base, característica dos CIVCs e pela polimerização do monômero resinoso que se inicia por ativação pela luz (Wilson,²⁸ 1990). A reação de fotopolimerização determina a formação de uma matriz polimérica, a qual protege a reação ácido-base de uma possível contaminação inicial pela umidade (Wilson,²⁸ 1990). Contudo, a subpolimerização resulta em inadequada conversão de monômeros em polímeros, sendo que estes monômeros residuais liberados do corpo do material podem causar intenso efeito citotóxico (Bouillaguet et al.,² 1996; Stanislowski et al.,²⁷ 1999; Costa et al.,⁵ 2003). Conseqüentemente, como demonstrado por

Aranha et al.¹ (2006), a fotoativação apresenta um papel importante na redução da citotoxicidade dos CIVMRs, sendo que a utilização do tempo de fotoativação recomendado pelo fabricante pode prevenir efeitos tóxicos sobre as células pulpares.

Apesar da melhora nas propriedades mecânicas, os efeitos citotóxicos dos CIVMRs parecem ser mais evidentes quando comparados àqueles dos CIVCs (Lan et al.,²⁰ 2003). Tem sido relatado que a elevada citotoxicidade dos CIVMRs se deve à liberação de HEMA (Stanislowski et al.,²⁷ 1999), que é um metacrilato capaz de se difundir através da dentina para alcançar o espaço pulpar (Gerzina et al.,¹³ 1996), ou por produtos da decomposição do agente iniciador de polimerização (Geurtsen et al.,¹⁴ 1998).

Considerando as diferenças de composição entre os CIVCs e os CIVMRs e, baseado no fato de que os odontoblastos são as primeiras células da polpa afetadas por componentes de materiais que apresentam capacidade de difusão transdentinária, o objetivo desta pesquisa foi analisar o comportamento de células de linhagem odontoblástica quando expostas aos produtos liberados por estes materiais ionoméricos.

MATERIAIS E MÉTODO

Para a realização deste estudo, foram utilizados dois cimentos de ionômero de vidro para restauração, um convencional (Ketac Fil Plus – 3M/ESPE, St. Paul, USA) e um modificado por resina (Fuji II LC – GC, Tokyo, Japan). Como controle negativo foi usado o próprio meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – SIGMA Chemical CO., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Tabela 1).

Os materiais experimentais foram manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes e introduzidos, com auxílio de seringa Centrix (Centrix incorporated, Connecticut, USA), em matrizes bipartidas de aço inoxidável. Assim, foram obtidos corpos de prova padronizados, com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

TABELA 1 – Composição, proporção pó-líquido e tempo de fotoativação e tempo de presa inicial dos materiais.

Nome comercial (fabricante)	Composição (porcentagem em peso)	Proporção pó/líquido (em peso)	TRF/tempo de presa inicial
Ketac Fil Plus 3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA	Pó: pó de vidro – ? 100% Líquido: água – 60-65% ácido polietileno policarbonico -30-40% ácido tartárico – 5-10%	3,2:1	7 min
Fuji II LC GC, Tokyo, Japan	Pó: alumino-silicato de vidro – 100% Líquido: ácido poliacrílico – 20-22% 2-hidroxiethyl metacrilato – 35-40% outros componentes – 5-15% 2,2,4 trimetil hexametileno dicarbonato – 5-7% trietileno glicol dimetacrilato – 4-6%	3,0:1	20 s
DMEM (SIGMA Chemical CO., St. Louis, MO, USA)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 100 UI/mL de penicilina 100 µg/mL de estreptomicina 2 mM de glutamina + 10% de soro fetal bovino	Líquido	–

Para a fotoativação do Fuji II LC (GC, Tokyo, Japan) foi utilizado o aparelho fotopolimerizador Optilux 500 (Demetron/Kerr, Danbury, CT, USA), com intensidade média de luz de 450 mW/cm², monitorada por radiômetro durante todo o experimento. O aparelho foi posicionado a um milímetro da superfície do corpo de prova, diretamente sobre uma lâmina de vidro, a qual foi colocada sobre o material experimental inserido na matriz metálica. Sobre esta lâmina de vidro foi aplicado um peso de 500 g para eliminação dos excessos de material. O CIVC (Ketac Fil Plus) permaneceu nas matrizes por 10 minutos para garantir a presa inicial.

Imediatamente após a presa, os corpos de prova foram removidos das matrizes e permaneceram em estufa com 100% de umidade a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, cada corpo de prova foi posicionado na base de compartimentos (*wells*) de uma placa de acrílico esterilizada de 24 *wells* (Costar Corp., Cambridge, MA, USA), onde foi aplicado 1,1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino (DMEM-SFB). Após 24 horas de manutenção dos corpos de prova imersos em DMEM-SFB, esta solução contendo os produtos liberados pelos materiais em teste, teve o pH ajustado para 7,4 (Tabela 2), com o auxílio de pHmetro digital (PG 2000, GEHAKA, São Paulo, SP). Em seguida, o DMEM-SFB com os componentes liberados dos materiais, agora denominado de extrato, foi filtrado em filtro de 0,22 µm (Sterile Syringe Filter, Corning®, NY 14831, Germany) e finalmente suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil), caracterizando o extrato final dos materiais, o qual foi aplicado diretamente sobre as células MDPC-23.

TABELA 2 – Apresentação dos valores de pH do extrato dos materiais antes e após o ajuste.

Material	pH do extrato	pH do extrato pós ajuste
Ketac Fil PLUS	8,41	7,43
Fuji II LC	8,44	7,49
DMEM	7,4	7,4

1 Análise do Metabolismo Celular

Para avaliação do metabolismo das células em contato com os extratos obtidos dos materiais ionoméricos em estudo, 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado, contendo 6x10⁴ células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 (Hanks et al.,¹⁵ 1998) foi introduzido em cada *well* de uma placa esterilizada para cultura de células de 24 *wells* (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Esta placa foi mantida por 48 horas em incubadora com 100% de umidade a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Em seguida, o meio de cultura em contato com as células foi aspirado, sendo então substituído pelos extratos dos materiais experimentais ou do grupo controle. Oito *wells* foram utilizados para cada extrato obtido (Tabela 3), sendo que estas soluções experimentais e controle foram incubadas em contato com as células MDPC-23 pelo período adicional de 24 horas.

TABELA 3 – Apresentação do número de amostras por material, segundo o teste aplicado.

Material	Viabilidade celular	Morfologia celular	Total
Ketac Fil Plus	8	2	10
Fuji II LC	8	2	10
DMEM	8	2	10
Total	24	6	30

Decorrido este período de 24 horas, foi realizada a análise do metabolismo celular, por meio da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células, usando para isto o teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT assay) (Mosmann,²⁴ 1983). Para atingir este objetivo, os extratos foram aspirados e substituídos por 900 μ L de meio de cultura DMEM suplementado, ao qual foram adicionados 100 μ L de solução de MTT (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2(-brometo difeniltetrazolium), (Across Organics, New Jersey, USA), numa concentração de 5 mg/mL de PBS. Após 4 horas de incubação das células em contato com a solução de MTT, esta foi aspirada de cada *well*, sendo então aplicado 600 μ L da solução de isopropanol acidificado em HCL a 0,04N para solubilizar os cristais de coloração azul/violeta formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima SDH das mitocôndrias ativas. Após solubilização, três alíquotas de 100 μ L da solução de cada *well* foram transferidas para placas de acrílico esterilizadas de 96 *wells*. A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (ELX 800 – Universal Microplate Reader – BIO-TEK Instruments, ICC, USA), num comprimento de onda de 570 nm. Os dados numéricos obtidos foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, considerando um nível de significância de 5%.

2 Análise da morfologia celular

Dois wells representativos de cada grupo experimental e controle foram preparados para análise da morfologia celular por meio de microscopia eletrônica de varredura (Tabela 3). Para isto, lamínulas de vidro com 12 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) foram este-

rilizadas e posicionadas no fundo dos *wells* imediatamente antes das células MDPC-23 serem semeadas, como foi descrito anteriormente. Assim, após a incubação das células em contato com os extratos experimentais e controle, estes foram aspirados dos *wells*, sendo que as células MDPC-23 que permaneceram aderidas ao substrato de vidro posicionado na base dos *wells* foram fixadas por uma hora com 1mL de glutaraldeído a 2,5% e, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por mais uma hora.

Em seguida, procedeu-se a desidratação através de trocas periódicas de soluções de etanol em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Finalmente, as células aderidas às lamínulas de vidro foram submetidas ao tratamento com a solução de 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazane 98% (HMDS – Across Organics, New Jersey, USA). Então, as lamínulas de vidro, com as células sobre a superfície, foram removidas da base dos *wells*, fixadas em *stubs* de aço, os quais foram mantidos em dessecador por 12 horas. Decorrido este período, as amostras foram metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (DSM 960, Zeiss, West Germany) para determinação da morfologia celular.

RESULTADOS

1 Metabolismo celular (Teste do MTT)

Os valores numéricos obtidos por meio da análise realizada no Leitor de ELISA para três alíquotas de cada amostra, determinaram uma média da atividade mitocondrial (metabolismo celular) para a mesma. A média das oito amostras determinou o metabolismo celular frente à exposição ao extrato de cada um dos materiais estudados (Tabela 4).

TABELA 4 – Apresentação dos valores referentes ao metabolismo celular (Teste do MTT) para cada amostra, média e desvio padrão para todos os materiais avaliados.

Material	Metabolismo Celular (Teste do MTT)								Média (DP)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
KETAK FIL	0,9397	1,0404	1,0157	1,0851	0,7282	0,9091	1,0404	1,0018	0,97005 (0,1129)
FUJI IILC	0,7498	0,9760	0,7232	0,8363	0,8098	1,0184	0,9265	0,9929	0,8791 (0,1144)
DMEM	0,8103	0,9848	1,0302	0,9702	0,8092	1,0033	1,0512	0,7980	0,93215 (0,1076)

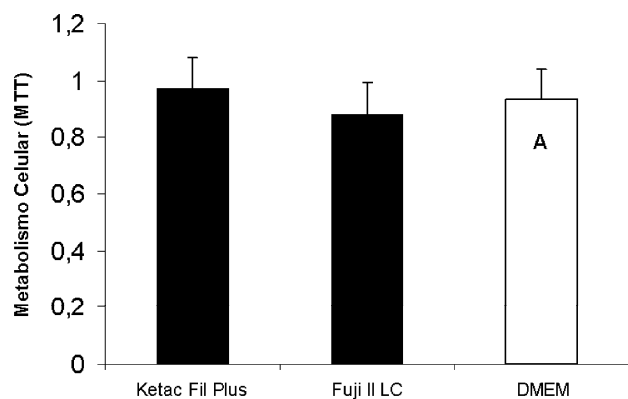
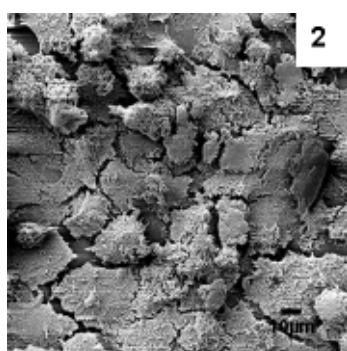
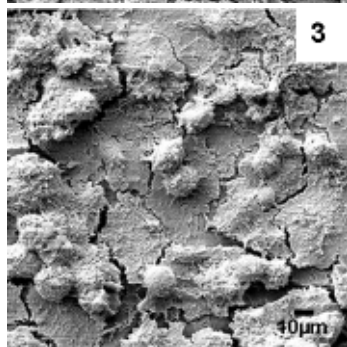


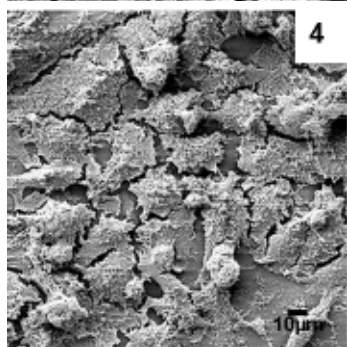
Figura 1 – Metabolismo celular (MTT) segundo os materiais estudados. Colunas com letras iguais apresentam resultados estatisticamente semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$). Barras correspondem a um desvio padrão.



Grupo controle
DMEM



Ketac Fil Plus



Fuji II LC

Figuras 2-4 – Presença de grande número de células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro. Note que estas células apresentam múltiplos prolongamentos citoplasmáticos originados de suas membranas, sendo que algumas pequenas células arredondadas caracterizam a finalização do processo de mitose no local (MEV, 500×).

A dispersão dos dados foi analisada por meio do teste de normalidade de Sapiro-Wilk ($n < 50$), o qual constatou a distribuição não normal dos mesmos ($p > 0,05$). Por esta razão, selecionou-se, para a análise estatística, o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual mostrou não existir diferença significativa entre os materiais estudados ($p > 0,05$), com relação ao metabolismo celular (Figura 1).

2 Morfologia Celular em Microscopia Eletrônica de Varredura

No grupo controle negativo (DMEM), foi observado grande número de células MDPC-23 sobre as lamínulas de vidro. Morfologicamente, estas células apresentavam-se ligeiramente alongadas e com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos, os quais pareciam aderir-las ao substrato de vidro (Figura 2). Grande número de células com morfologia semelhante àquela das células do grupo controle também foi observado para os dois grupos experimentais avaliados (Figuras 3 e 4).

DISCUSSÃO

Testes de citotoxicidade sobre células em cultura têm sido empregados para realizar a avaliação inicial do potencial de agressão de diferentes materiais odontológicos sobre tecidos vivos (Cao et al.,³ 2005). Todavia, tem sido descrito que independente do material selecionado para aplicação sobre o assoalho de cavidades profundas em dentina, ou mesmo sobre a polpa exposta, este tecido conjuntivo apresenta capacidade de reparação, desde que a contaminação seja prevenida (Cox et al.,⁷ 1987). Porém, muitos pesquisadores têm demonstrado que além de bactérias e seus produtos altamente tóxicos, os próprios materiais dentários podem liberar componentes que apresentam capacidade de se difundir através dos túbulos dentinários para causar danos às células pulpares (Hebling et al.,¹⁷ 1999; Costa et al.,⁴ 2001). Particularmente quando aplicados sobre polpas mecanicamente expostas, componentes químicos liberados de materiais podem desencadear reação inflamatória crônica mediada por macrófagos e células gigantes. Nestes casos, foi observada degradação do tecido pulpar, associada a reabsorções dentinárias internas (Hebling et al.,¹⁶ 1999; Nascimento et al.,²⁵ 2001; Costa et al.,⁶ 2003). Desta maneira, na presente pesquisa, dois cimentos de ionômero de vidro restauradores, um convencional e o outro modificado por resina, fo-

ram avaliados quanto a citotoxicidade de seus componentes liberados em contato com umidade. Os dados obtidos, certamente podem prever a solubilidade destes materiais experimentais e seus possíveis efeitos tóxicos, especialmente quando aplicados em contato com umidade, como acontece em situações de cavidades profundas, nas quais a dentina apresenta elevada permeabilidade.

Tem sido demonstrado que mesmo componentes liberados de materiais restauradores podem se difundir através da dentina para alcançar o tecido pulpar (Gerzina et al.,¹³ 1996). Como os odontoblastos são células específicas da polpa, e estão organizados em monocamada revestindo as paredes internas de dentina, tem sido relatado que este tipo celular é o ideal para a análise dos efeitos citotóxicos causados pela difusão transdentinária de componentes liberados de materiais odontológicos (MacDougall et al.,²² 1998). Assim, na presente pesquisa, células imortalizadas da linhagem odontoblástica MDPC-23, as quais apresentam marcadores fenotípicos de odontoblastos (Hanks et al.,¹⁵ 1998), foram selecionadas para a avaliação da citotoxicidade dos componentes dos cimentos de ionômero de vidro liberados em meio aquoso.

Os CIVCs são considerados biocompatíveis, determinando uma reação pulpar discreta (McLean,²³ 1984). Entretanto, os CIVMRs, que combinam as propriedades benéficas dos CIVs convencionais (adesão aos tecidos dentários e liberação de flúor) com a fácil manipulação e melhores propriedades mecânicas dos compósitos fotopolimerizáveis, parecem ser mais tóxicos do que os primeiros (Stanislowski et al.,²⁷ 1999). O efeito agressivo *in vivo* dos CIVMRs parece ocorrer devido ao fato de que durante a reação de presa ocorre um significativo aumento da temperatura e alteração do pH local, além da liberação de vários íons e monômeros residuais (Gerzina et al.,¹³ 1996, Kawai et al.,¹⁹ 2002). A liberação de íons hidrogênio (Kawai et al.,¹⁹ 2002) durante a reação ácido-base, mantém o pH dos cimentos de ionômero de vidro baixo por até 60 minutos, e, apesar da fotoativação aumentar significativamente o pH da superfície dos CIVMRs, este ainda se mantém relativamente baixo por algum tempo (Woolford et al.,³⁰ 1992). Para a realização da presente pesquisa, antes dos corpos de prova serem colocados em contato com o meio de cultura para a obtenção dos extratos, eles permaneceram por 60 minutos em estufa úmida a 37°C, até que pudessem alcançar um maior grau de presa. Provavelmente, em decorrência disso, os extratos obtidos de ambos os materiais não apresentaram pH ácido (valor mé-

dio de pH = 8.4). Diferente do que acontece nas situações clínicas, na presente pesquisa o pH dos extratos foi ajustado para 7,4 devido ao fato de estar estabelecido na literatura que células em cultura apresentam melhores condições de metabolismo e multiplicação em valores de pH que variam de 7,0 a 7,7 (Eagle,⁸ 1973). Desta maneira, a neutralização do pH dos extratos fez com que esta variável, a qual tem sido relatada como fator importante no processo de lesão celular, fosse eliminada como um dos possíveis fatores responsáveis pelos efeitos citotóxicos dos materiais experimentais. Este procedimento permitiu que apenas o efeito dos componentes solúveis no meio de cultura fosse avaliado como principal fator de citotoxicidade para as células MDPC-23.

Stanislowski et al.²⁷ (1999), estudando cinco diferentes CIVMRs obtiveram extratos com pH variando de 7,2 a 7,4, o que lhes permitiu concluir que a citotoxicidade demonstrada para os cimentos de ionômero de vidro avaliados não pode ser explicada apenas pela variação do pH. Assim, na presente pesquisa, onde foi permitida uma adequada reação de presa dos materiais experimentais antes de sua colocação em contato com o meio de cultura, o que resulta em menor solubilidade em meio aquoso, pode ter determinado uma pequena liberação de componentes, quantidade esta insuficiente para causar danos significativos às células MDPC-23. Todavia, para definir quais componentes e também quantificá-los no meio de cultura, seria necessária uma avaliação dos extratos com técnicas específicas para a determinação de íons e de monômeros resinosos. Há alguns anos, tem sido demonstrado que alguns íons, tais como flúor, alumínio, prata, silício, estrôncio, zinco e silicato podem ser liberados durante o processo de presa e degradação dos cimentos de ionômero de vidro (Kan et al.,¹⁸ 1997, Lönnroth et al.,²¹ 2001 e Kawai et al.,¹⁹ 2002). Entretanto, segundo Stanislowski et al.²⁷ (1999), nos CIVMRs a concentração destes íons liberados, com exceção do zinco, é insuficiente para induzir efeitos tóxicos às células. Por outro lado, o 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA), que é um componente presente na composição da maioria dos CIVMRs, e que apresenta elevado efeito citotóxico (Bouillaguet et al.,² 1996) pode ser facilmente liberado em meio aquoso. Segundo Fujisawa et al.¹¹ (1988), monômeros metacrilatos, como o HEMA, são incorporados na dupla camada lipídica das membranas celulares provocando a sua solubilização, mecanismo responsável pela intensa citotoxicidade deste monômero, mesmo em baixas concentrações.

Assim como realizado na presente pesquisa, Kan et al.¹⁸ (1997) também avaliaram a citotoxicidade de extratos obtidos de CIVCs e de CIVMRs após filtragem em filtros de Millipore 0,22 μm e ajuste do pH para 7,2-7,3. Porém, os autores aplicaram estes extratos sobre cultura de fibroblastos de camundongos (Balb/3T3 A31), sendo demonstrado que estes apresentaram citotoxicidade mínima, com redução do metabolismo celular de no máximo 30% quando comparado com o controle. De acordo com estes autores, o CIVMR (Fuji II LC) e o CIVC em estudo apresentaram metabolismo de $102,8\% \pm 9,8$ e $85,7\% \pm 17,5$, respectivamente, quando comparados com o controle, o qual representou 100% de metabolismo das células em cultura. Estes dados foram semelhantes aos observados na presente pesquisa, onde os cimentos Fuji II LC e Ketac Fil Plus apresentaram taxa de metabolismo para as células MDPC-23 de 94,31% e 104,06%, respectivamente e, não houve diferença estatisticamente significativa entre estes grupos experimentais e o controle. Por outro lado, Lönnroth et al.²¹ (2001), trabalhando com fibroblastos de camundongos L929, e realizando a filtragem e o ajuste do pH (7,0) dos extratos obtidos de diferentes CIVs, observaram uma alta citotoxicidade, com menos de 30% de células viáveis, sendo que o Fuji II LC foi o material mais citotóxico. Estes autores justificaram seus resultados devido a uma elevada liberação de íons flúor e alumínio para os extratos, sendo que ambos podem interferir na estabilidade das membranas celulares ou inibir a atividade respiratória das mitocôndrias. Provavelmente, esta elevada liberação de íons flúor e alumínio pode ter ocorrido devido ao fato de os extratos terem sido obtidos pela imersão de corpos de prova não polimerizados em meio líquido por 24 horas ou, pela manutenção de corpos de prova recentemente polimerizados ou envelhecidos por 24 horas, em meio líquido por um período de 6 dias. Situação completamente diferente foi observada na presente pesquisa, onde os extratos foram obtidos de corpos de prova nos quais a finalização da reação de presa foi aguardada (60 minutos), sendo que apenas após este procedimento, os corpos de prova foram imersos por 24 horas no meio de cultura.

Trabalhos recentes realizados *in vitro* mostraram que o CIVMR Vitrebond (3M ESPE), o qual é recomendado especificamente para forramento cavitário, apresenta intenso efeito citotóxico sobre células MDPC-23 em cultura (Costa et al.,⁵ 2003; Aranha et al.,¹ 2006; Souza et al.,²⁶ 2006). O mes-

mo material, utilizado em estudos *in vivo*, causou reduzida irritação para o tecido pulpar quando aplicado sobre dentina (Costa et al.,⁶ 2003). Todavia, não há na literatura, pesquisas similares, avaliando os CIVCs ou CIVMRs restauradores quando aplicados em cavidades dentárias profundas. Os dados obtidos na presente pesquisa, os quais demonstraram a baixa citotoxicidade dos cimentos ionoméricos Fuji II LC e Ketac Fil Plus sobre as células MDPC-23 determinaram, de maneira preliminar, que estes materiais devem ser usados em pesquisas futuras para comprovar sua possível biocompatibilidade com o complexo dentinopulpar.

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais deste trabalho foi possível concluir que os materiais ionoméricos avaliados apresentaram baixo efeito citotóxico para as células de linhagem odontoblástica MDPC-23.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa (Processos: 116273/2005-4, 306029/2004-9 e 302575/2004-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aranha AMF, Giro EMA, Souza PPC, Hebling J, Costa CAS. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. Dent Mater. 2006 (in press).
2. Bouillaguet S, Wataha JC, Hanks CT, Ciucchi B, Holz J. In vitro cytotoxicity and permeability of HEMA. J Endod. 1996;22(5):244-8.
3. Cao T, Saw TY, Heng BC, Liu H, Yap AUJ, Ng ML. Comparison of different test models for assessment of cytotoxicity of composite resins. J Appl Toxicol. 2005;(25):101-8.
4. Costa CAS, Nascimento ABL, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. Dent Mater. 2001;17(3):230-40.
5. Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. Biomaterials. 2003;24(21):3853-8.
6. Costa CAS, Giro EMA, Nascimento ABL, Teixeira HM, Hebling J. Short-term evaluation of the pulp-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. Dent Mater. 2003;19(8):739-46.
7. Cox CF, Keall CL, Keal HJ, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed dental pulps. J Prosthet Dent. 1987;57:1-8.

8. Eagle H. The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J Cell Physiol.* 1973;82:1-8.
9. Erickson RL, Glasspoole EA. Bonding to tooth structure: a comparison of glass-ionomer and composit-resin systems. *J Estht Dent.* 1994;6: 227-44.
10. Exterkate RA, Damen JJ, Ten Cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. *Caries Res.* 2005;39(6): 509-13.
11. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. 1H and 13C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipids liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988;67:1438-41.
12. Gandolfi MG, Chersoni S, Acquaviva GL, Piana G, Prati C, Mongiorgi R. Fluoride release and absorption at different pH from glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006 (in press).
13. Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine *in vitro.* *J Dent.* 1996;24(1-2): 125-8.
14. Geursten W, Spahl W, Leyhausen G. Residual monomer/additive release and variability in cytotoxicity of light-curing glass-ionomer cements and compomers. *J Dent Res.* 1998;77(12):2012-9.
15. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edeards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connective Tissue Res.* 1998;37(3-4):233-49.
16. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endodont.* 1999;25:676-82.
17. Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Human pulp response after na adhesive system application in deep cavities. *J Dent.* 1999;27(8):557-64.
18. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in cytotoxicity and fluoride release of resin-modified glass-ionomer cements. *J Dent Res.* 1997;76(8): 1502-7.
19. Kawai K, Takaoka T. Fluoride, hydrogen ion and HEMA release from light-cured GIC restoratives. *Am J Dent.* 2002;15:149-52.
20. Lan WH, Lan WC, Wang TM, Lee YL, Tseng WY, Lin CP, et al. Cytotoxicity of conventional and modified glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2003;28(3): 251-9.
21. Lönnroth EC, Dahl JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyl-tetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand.* 2001;59:34-9.
22. MacDougall M, Selden JK, Nydegger JR, Cames DL. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing. *Am J Dent.* 1998;11:S11-16.
23. McLean JW. Alternative to amalgam alloys. *Br Dent J.* 1984;157:432-33.
24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
25. Nascimento ABL, Fontana UF, Teixeira HM, Costa CAS. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent.* 2000;13:28-34.
26. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006 (in press).
27. Stanislawski L, Daniau X, Lauti A, Goldberg M. Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res.* 1999;49(3):277-88.
28. Wilson AD. Resin-modified glass-ionomer cements. *Int J Prosthodont.* 1990;3(5):215-9.
29. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry: the glass-ionomer cement. *Br Dent J.* 1972;132(4):133-5.
30. Woolford MJ, Chadwick RG. Surface pH of resin-modified glass polyalkenoate (ionomer) cements. *J Dent.* 1992;20:359-64.

Recebido para publicação em: 27/07/2006; aceito em: 25/09/2006.

Endereço para correspondência:

ELISA MARIA APARECIDA GIRO
Departamento de Clínica Infantil
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
Rua Humaitá, 1680 – Centro
CEP 14801-903, Araraquara, SP, Brasil
Fone: (16) 3301-6336
E-mail: egiro@foar.unesp.br