



Avaliação Comparativa da Citotoxicidade de Adesivos Autocondicionantes em Linhagem de Fibroblastos 3T3

Gabriel Tavares¹, Cintia Fernanda de Freitas Bernardo², Francielly Fernanda de Freitas A. de Souza³, Camila n. M. Ribeiro⁴, Yasmine Mendes Pupo⁵, Daniela Florencio Maluf⁶

Resumo

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* de sistemas adesivos autocondicionantes de passo único ou dois passos sobre células fibroblásticas da linhagem 3T3. O preparo do material foi realizado utilizando lamínulas de vidro para microscopia estéreis (n=3), nas quais foram aplicados os sistemas adesivos autocondicionantes (Optibond All-In-one [OPT] e Clearfil™ SE Bond [SE]) que, em seguida, foram fotoativados. As lamínulas tratadas foram colocadas em placas de 06 poços contendo meio de cultura RPMI suplementado com SFB (10%) e antibióticos. Como controle negativo foram usadas lamínulas imersas apenas em meio de cultura. Após 24 horas de incubação, cada meio de extração obtido foi filtrado e aplicado sobre a cultura de fibroblastos. A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria pelo método do MTT. A absorvância foi expressa em valores numéricos, que foram submetidos à análise estatística para determinar o efeito dos sistemas adesivos em estudo sobre a atividade mitocondrial das células. A morfologia das células foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados de viabilidade foram analisados por testes de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) e de Kruskal-Wallis. Os sistemas adesivos reduziram significativamente a viabilidade celular OptiBond All-In-One (32.1%) e Clearfil™ SE Bond (34.7%), quando comparados ao controle negativo. A toxicidade foi diretamente relacionada com a presença de monômeros residuais e outros componentes nos meios de extração, que são capazes de reduzir a atividade mitocondrial, causando alterações morfológicas na membrana celular de fibroblastos. Conclui-se que, os adesivos autocondicionantes pesquisados demonstraram efeito citotóxico, porém sem diferir entre os adesivos avaliados, apesar de serem disponibilizados em um ou dois passos.

Palavras-chave: Adesivos dentinários. Biocompatibilidade. Citotoxicidade. Propriedades físico-químicas.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of self-etching primer adhesive systems on fibroblastic cell line 3T3. The preparation of the material was held using sterile glass coverslips for microscopy (n=3), in which they were applied self-etching adhesives: Optibond all-in-one [OPT] and Clearfil™ SE Bond [SE] for further light cured. Cells treated were placed in 06 wells plates containing culture medium RPMI supplemented with SFB(10%) and antibiotics. As negative control, cells were treated with the culture medium only. After 24 hours of incubation, each extraction medium obtained was filtered and applied into the cell culture. Cell viability was assessed by spectrophotometry by MTT method. The absorbance was expressed as numeric values, which were submitted to statistical analysis to determine the effect of adhesive systems in study on mitochondrial activity of cells. The morphology of the cells was obtained by scanning electron microscopy (SEM). The feasibility data were analyzed by Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$) and Kruskal-Wallis. All adhesive systems significantly reduced cell viability, OptiBond All-In-One (67,9 % \pm 3,9) e Clearfil™ SE Bond (65,3% \pm 6,1), when compared to the negative control. The toxicity was directly related to the presence

1 Acadêmico do curso de Biotecnologia, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

2 Acadêmica do curso de Odontologia, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

3 Acadêmica do curso de Odontologia, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

4 Doutora em Ciências Biomédicas pela USP. Coordenadora do Curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

5 Doutora em Dentística Restauradora. Professora Adjunta da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

6 Doutora em Ciências Farmacêuticas, Professora adjunta do curso de Biomedicina da Universidade Tuiuti do Paraná e Professora adjunta do curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

of residual monomers and other components in extraction, which are able to reduce the mitochondrial activity, causing morphological changes in the cell membrane of fibroblasts. The self-etching adhesive systems surveyed demonstrated cytotoxic effect of varied intensity, possibly modulated by differences in their chemical composition and solubility in aqueous media.

Keywords: Dentin adhesives. Biocompatibility. Cytotoxicity. Physical-Chemical properties.

1 Introdução

Os sistemas adesivos odontológicos contêm uma mistura de monômeros resinosos, os quais têm funções na citotoxicidade e modulação celular (SÖDERHOLM, 1991). De acordo com BIANCHI *et al.* (2013), monômeros resinosos presentes na composição de sistemas adesivos, como TEGDMA, HEMA, BIS-GMA e UDMA, apresentaram citotoxicidade quando utilizados em cavidades profundas ou em contato direto com o tecido pulpar. Os autores afirmaram que estes monômeros podem comprometer as funções celulares básicas, tais como a proliferação, atividade enzimática e respiração mitocondrial, também induzindo alterações na morfologia celular e integridade da membrana.

Diversos estudos têm sido direcionados para a avaliação da degradação dos materiais adesivos dentinários, as quais podem ser atribuídas, por exemplo, a natureza hidrófila de alguns monômeros utilizados na composição de adesivos dentinários, a concentração de água necessária para ionização dos monômeros ácidos em adesivos autocondicionantes (PERDIGÃO, *et al.*, 2013). Diante destas modificações nas formulações químicas dos sistemas adesivos e devido a padronização na literatura de modelos de estudos de citotoxicidade em cultura celular, estudos precisam ser realizados em relação à biocompatibilidade destes materiais, considerando que monômeros residuais podem causar danos irreversíveis ao tecido pulpar (ELIAS *et al.* 2015). No entanto, uma vez que os componentes hidrófobos e hidrofílicos são combinados em um frasco único, os adesivos são quimicamente instáveis, que é compensado por vários aditivos e um pH mais baixo (LEE *et al.* 2016).

Devido ao constante aprimoramento dos sistemas adesivos autocondicionantes, objetiva-se avaliar de maneira preliminar e comparativa, a citotoxicidade destes sistemas em frasco único ou em dois passos quando aplicados diretamente sobre as células fibroblásticas da linhagem 3T3. Postula-se que os sistemas adesivos autocondicionantes de dois passos possam ser menos prejudiciais para as células em estudo do que os sistemas adesivos de frasco único.

2 Material e Métodos

A resposta de fibroblastos induzida por substâncias lixiviadas ou dissolvidas a partir de sistemas adesivos comerciais foi analisada por ensaio em cultura de células de fibroblastos 3T3. A linhagem de células foi crescida como mono camadas no meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% da solução de antibióticos penicilina 10.000 UI/ estreptomicina 10.000 mg/mL. As células foram mantidas a temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ em

incubadora umidificada. Para todas as fases do experimento, as células foram descoladas com solução de tripsina (0,25%)/ EDTA (1 mM). Todos os reagentes de cultura celular foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). A linhagem celular utilizada está descrita no ATCC (American Type Culture Collection).

Os sistemas adesivos em estudo foram: [OPT] “adesivo autocondicionante de passo único”: OptiBond All-In-One e [SE] “adesivo autocondicionante de dois passos”: Clearfil™ SE Bond. Na Tabela 1 estão apresentados os fabricantes e a composição dos sistemas adesivos em estudo.

TABELA 1- Composição dos sistemas adesivos em estudo

Fabricante	Composição
OptiBond All-In-One	GPDM, HEMA, GDMA, Bis-GMA, água, 2,5-3 acetona, etanol, CQ, sílica de enchimento de sódio, hexafluorosilicate Metacrilato
Clearfil™ SE Bond	MDP (10-Metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato), Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato hidrofóbico de canforoquinona, N.N- Dietanol p-toluidina, Sílica coloidal silanizada

Bis-GMA: bisfenol-A diglicidildimetacrilato; HEMA: 2-hidroxietil metacrilato; CQ: canforoquinona; UDMA: uretano dimetacrilato; 10-MDP: 10-metacrilóiloxi metacrilato; GPDM: dimetacrilato de fosfato glicerol; GDMA: glicidildimetacrilato.

2.1 Preparo do material

Em lamínulas circulares estéreis (MODELO:G-13C/100, Glasscyto, Bioslide Technology, Walnut, CA, USA), com \varnothing 13 mm de diâmetro e 0,13 mm de espessura, foram aplicados 10 μ L de cada sistema adesivo e fotoativados por 10 segundos por meio de um aparelho de luz LED (Valo, Ultradent Products Inc, South Jordan, USA), previamente avaliado quanto a intensidade de luz em radiômetro e calibrado em 1400mW/cm². A ponta do aparelho fotopolimerizador foi colocada o mais próximo possível (cerca de 2 mm) das lamínulas sem tocá-las. Lamínulas do grupo controle (n=5) não foram impregnadas com sistemas adesivos.

Todas as lamínulas foram dispostas, em triplicata, em placas de 06 poços (Corning Incorporated, Corning, NY) contendo em cada poço 1 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% da solução de antibióticos penicilina 10.000 UI/estreptomicina 10.000 mg/mL e incubadas durante 24 h em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Depois deste período, os meios de cultura contendo componentes lixiviados dos sistemas adesivos foram recolhidos e esterilizados por filtração em membrana filtrante de 0,22 μ m.

2.2 Análise de viabilidade celular

Através da análise de atividade mitocondrial foi determinada a viabilidade celular. Esta análise foi executada utilizando o ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT. O ensaio de MTT implica a conversão do MTT (3 - (4,5 – dimetiliazol – 2-il) -2,5-difeniltetrazólio), solúvel em água, para um composto insolúvel, o sal de formazan. O formazan é em seguida solubilizado, e a concentração determinada por densidade óptica a 570 nm.

Foi preparada uma suspensão celular de concentração $0,5 \times 10^5$ células/mL. A suspensão celular foi distribuída (100 μ L/poço) em placas de 96 poços e incubadas durante 24h em estufa umidificada com 5% de CO_2 a 37°C. Após este período, o meio foi aspirado e as células foram tratadas com meios obtidos de cada material em sextuplicata e incubadas a 5% de CO_2 a 37°C / 24 h.

As células que foram tratadas somente com o meio de cultivo representaram o grupo controle. Após este período, o meio foi aspirado e os poços foram lavados com 200 μ l de tampão fosfato estéril (PBS). O reagente MTT dissolvido em PBS estéril (0,5 mg/mL) foi acrescentado nos poços e as células foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO_2 durante 4 horas. O meio de cultura com a solução de MTT foi aspirado e, em seguida, substituído por 100 μ L de DMSO puro para permitir a dissolução dos cristais de violeta de formazan que resultaram da clivagem do MTT pela enzima SDH presente na mitocôndria de células viáveis.

Foi avaliada a viabilidade celular por espectrofotometria como sendo proporcional à absorvância medida a 570 nm de comprimento de onda com auxílio de leitor de microplacas (ELX 800, BioTek Instruments, Winooski, VE, EUA). Os dados de absorvância foram transformados em relação ao número de células viáveis (%) comparados ao grupo controle.

A média dos valores obtidos a partir das seis alíquotas foi calculada assim como o desvio padrão, os quais foram submetidos à análise estatística para determinar o efeito dos sistemas adesivos em estudo sobre a atividade mitocondrial das células.

3 Resultados e Discussão

O gráfico 1 mostra a Porcentagem de viabilidade celular dos sistemas adesivos testados com relação ao grupo controle.

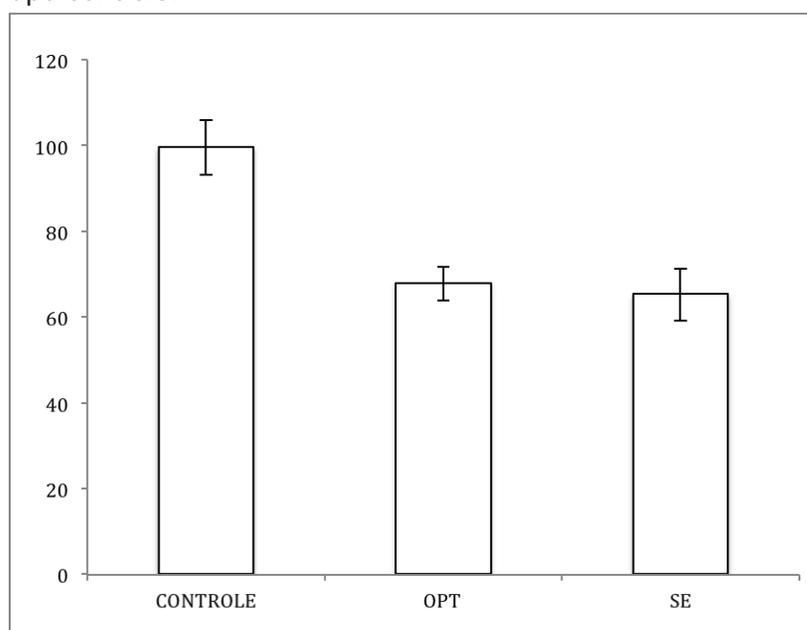


GRÁFICO 1- Porcentagem de viabilidade celular dos sistemas adesivos testados em relação ao grupo controle.



Diversos estudos têm sido aplicados para avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos e seus componentes (LANZA *et al.* 2006). Esses materiais não devem ter efeitos prejudiciais sobre as estruturas dentárias, apresentando biocompatibilidade aliada à durabilidade (SENGÜN *et al.* 2011) e sendo capazes de evitar infiltração bacteriana e selar cáries dentárias (CAVALCANTI, *et al.*, 2010). No entanto, o contato direto dos sistemas adesivos sobre o tecido pulpar deve ser evitado, pois isto pode provocar uma reação inflamatória intensa e persistente sobre as células (CAVALCANTI, *et al.*, 2010; ELIAS *et al.* 2015).

A avaliação da citotoxicidade de sistemas adesivos através do teste *in vitro* em cultura de células é preferida pela homogeneidade das amostras e a facilidade de uma padronização, além de ser um método conveniente, controlável e reproduzível (KIM, *et al.*, 2014), que proporciona o controle de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ (VAJRABHAYA *et al.*, 2009). Além disso, pode fornecer informações sobre a citotoxicidade das substâncias lixiviadas ou dissolvidos no meio de cultura, que podem simular a condição clínica úmida geralmente encontrada quando o tecido pulpar é exposto (CAVALCANTI *et al.*, 2005). Através do padrão de morte celular, pode-se avaliar a citotoxicidade dos materiais adesivos, porque as células apoptóticas são removidas por fagocitose, ocasionando uma moderada resposta inflamatória, sendo que a necrose pode causar uma resposta inflamatória mais grave e danos para os tecidos circundantes (BIANCHI *et al.*, 2013). Pode-se então, após esses testes, direcionar os cuidados que devem ser realizados na utilização e aplicação desses materiais em procedimentos clínicos (COSTA *et al.*, 2006).

Estudos têm mostrado que os sistemas adesivos autocondicionantes têm obtido menor citotoxicidade e melhor resposta do tecido nas análises histológicas do que aqueles relacionados a sistemas adesivos convencionais (CAVALCANTI *et al.*, 2010). A difusão transdentária de componentes de sistemas convencionais pode reduzir a viabilidade celular em até 71% (CAMPS *et al.* 1997). Do mesmo modo, porém em menor amplitude, adesivos autocondicionantes também são tóxicos às células pulpares, resultando em diminuição de 26-35% na atividade metabólica celular (1).

Também pode ser observado no estudo de LANZA *et al.* (2006) que avaliaram através do MTT a difusão transdentária e citotoxicidade de adesivos autocondicionantes Clearfil™ SE Bond (SE), Clearfil™ Protect Bond (CPB), Adper Prompt (PR), e Xeno III (XE)) em células odontoblasticas. Os autores observaram que a redução da viabilidade celular promovida pelos sistemas autocondicionantes variou de 28,0% a 47,8%. Os resultados do presente estudo demonstraram que os sistemas adesivos investigados liberaram componentes em concentrações capazes de influenciar negativamente a respiração mitocondrial das células pulpares. Apesar de estudos terem mostrado que os sistemas adesivos autocondicionantes serem menos citotóxicos que os convencionais, apresentam grau de toxicidade, sendo neste estudo os sistemas adesivos autocondicionantes, OptiBond All-In-One (32.1%) e Clearfil™ SE Bond (34.7%), tiveram resultados consideravelmente citotóxicos.

Os diferentes resultados adquiridos pelo teste de citotoxicidade de adesivos podem ser explicados pelas diferenças na sua composição química, na técnica de aplicação e propriedades

reológicas (LANZA *et al.* 2006). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os monômeros causam danos químicos quando são liberados para células cultivadas e tecido pulpar (PORTO *et al.* 2011). Enfim, para que seja possível comprovar definitivamente, quais substâncias são as responsáveis diretas pelos efeitos citotóxicos causados às células fibroblastos de linhagem 3T3, e qual a concentração de monômeros não reagidos e liberados no extrato, é preciso determinar e quantificar, através de normas específicas, a presença destes componentes no meio. Assim, estudos complementares *in vitro* e *in vivo* devem ser feitos de modo a fornecer a informação completa sobre a utilização de tais sistemas.

Conclusão

Conclui-se que os adesivos autocondicionantes pesquisados demonstraram efeito citotóxico significativo quando comparados ao controle, porém não foi possível atribuir tal toxicidade ao tipo de adesivo testado de acordo com o número de passos.

Referências

- BIANCHI, L.; RIBEIRO, AP.; CARRILHO, MR.; PASHLEY, DH.; DE SOUZA COSTA CA.; HEBLING J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. *J. Biomed Mater Res B. Appl Biomater.* 101(8):1498-507. 2013.
- 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.* 13(1):34-42. 1997.
- CAVALCANTI, BN.; BÄRSCHNEIDER, LR.; MARQUES, MM. Cytotoxicity of substances leached from a conventional and a self-etching adhesive system on human pulp fibroblasts. *Braz DentSci.* 13(2):10-14. 2010.
- CAVALCANTI, BN.; RODE, SM.; MARQUES, MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J.*38(8):505-9. 2005.
- COSTA. CAS.; HEBLING, J. Avaliação *in vitro* de sistemas adesivos de dentina aplicados sobre células odontoblastóides. *RevOdontol UNESP.* 35(1):97-106. 2006.
- ELIAS, ST.; SANTOS, AF.; GARCIA, FC.; PEREIRA, PN.; HILGERT, LA.; FONSECA-BAZZO, YM.; GUERRA, EN.; RIBEIRO, AP. Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. *Braz Dent J.* 26(2):160-8. 2015.
- KIM, MJ.; KIM, KN.; KIM, KM. Cytotoxicity test of one-step self-etching bonding agents by standardized dentin barrier test using polyurethane discs. *Materials.* 7(1):85-96. 2014;
- LANZA, CRM.; SOUZA COSTA, CA.; FURLAN, M.; ALÉCIO, A.; HEBLING, J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 25(6):533-43. 2009.
- LANZA, CRM.; JÚNIOR, LAL.; SOUZA, LB.; HEBLING, J.; COSTA, CAS. Inibição do metabolismo de células odontoblastóides induzida por sistemas adesivos autocondicionantes. *Robrac.* 15(40):23-33. 2006.
- LEE, Y.; AN, SY.; PARK, YJ.; YU, FH.; PARK, JC.; SEO, DG. Cytotoxic effects of one-step self-etching adhesives on an odontoblast cell line. *Scanning.* 38(1):36-42. 2016.
- PERDIGÃO, J.; REIS, A.; LOGUERCIO, AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J*



EsthetRestor Dent. 25(4):219-41. 2013.

PORTO, IC.; OLIVEIRA, DC.; RAELE, RA.; RIBAS, KH.; MONTES, MA.; DE CASTRO, CM. Cytotoxicity of current adhesive systems: in vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. Dent Mater. 27(3):221-8. 2011.

SENGÜN, A.; YALÇIN, M.; ÜLKER, HE.; ÖZTÜRK, B.; HAKK, SS. Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 112(3): e83-8. 2011.

SÖDERHOLM, KJ. Correlation of in vivo and in vitro performance of adhesive restorative materials: a report of the ASC MD156 Task Group on Test Methods for the Adhesion of Restorative Materials. Dent Mater. 7(2):74-83. 1991.

VAJRABHAYA, LO.; KORSUWANNAWONG, S.; BOSL, C.; SCHMALZ, G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 107(3):e86-90. 2009.