



Estudo da Citotoxicidade e da Morfologia Celular por Microscopia Eletrônica de Varredura de Células de Fibroblastos 3T3 Tratadas com Medicação Intracanal à Base de Hidróxido de Cálcio

Maelly da S. Fernandes¹, Andre Luiz da Costa Michelotto², Yasmine Mendes PuPO³, Sandro Germano⁴, Daniela Florencio Maluf⁵

Resumo

A endodontia tem por finalidade reduzir as contaminações bacterianas originadas no sistema de canais radiculares, as quais prejudicam a reparação tecidual. Sendo necessária a utilização de medicamentos capazes de desinfecionar e proporcionar condições importunas ao desenvolvimento bacteriano. O uso do hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] como medicação intra-canal, tem sido bastante empregado, devido suas inúmeras propriedades, tais como ação anti-inflamatória e antimicrobiana, biocompatibilidade, estimular a formação de tecidos ósseos mineralizados e auxiliar no processo do reparo tecidual. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a morfologia celular de fibroblastos 3T3 in vitro, tratados com medicações intracanal de hidróxido de cálcio. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas na estufa de CO₂ (5%) a 37°C. Após adesão, foram alimentadas em concentrações crescentes de Ca(OH)₂ (0,0001µL; 0,001µL; 0,01µL e 0,1µL) e somente com o meio de cultura para controle do experimento. Os resultados de viabilidade celular foram obtidos através do método Cristal Violeta e por microscopia eletrônica de varredura. A medicação intracanal à base de hidróxido de sódio apresentou discreta toxicidade em células de fibroblastos 3T3 a partir da concentração de 5 mg/mL.

Palavras-chave: Endodontia. Hidróxido de cálcio. Citotoxicidade.

Abstract

The endodontics aims to reduce bacterial contamination originated in endodontium, which cause instabilities in tissue repair. The use of drugs that can disinfect and provide importunate conditions for bacterial growth is required. The use of calcium hydroxide [Ca(OH)₂] in intracanal medications, has been one method widely employed because of its numerous beneficial properties, such as antiinflammatory action and antimicrobial, biocompatible, stimulate the formation of mineralized bone tissue and assisting in the tissue repair process. The objective of this study is to evaluate the cytotoxicity and cell morphology of 3T3 fibroblasts in vitro, treated with medications to intracanal calcium hydroxide. Cells were plated in 96-well plates and incubated in CO₂ incubator (5%) at 37°C. After adhesion, they were fed with increasing concentrations of Ca(OH)₂ (0,0001µL; 0,001µL; 0,01µL and 0,1µL) and only with the culture medium for the control experiment. The cell viability results were obtained through the Crystal Violet method and scanning electron microscopy.

Keywords: Endodontics. Calcium hydroxide. Cytotoxicity.

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

2 Doutor em Endodontia pela FOUSP. Coordenador do curso de Especialização em Endodontia da Faculdade São Leopoldo Mandic, Curitiba, PR

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

4 Doutor em Processos Biotecnológicos. Coordenador do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

5 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

1 Introdução

A endodontia, área da odontologia que trata as lesões e doenças pulpares e periapicais, tem por finalidade reduzir a contaminação desta região. A contaminação destes tecidos pode levar a instabilidade entre a agressão bacteriana e a resposta do organismo, dificultando desta maneira a reparação. Mesmo após procedimentos endodônticos convencionais, algumas patologias não regridem devido à persistência do microrganismo, sendo necessária a utilização de agentes capazes de complementar a desinfecção padrão e de proporcionar condições importunas ao desenvolvimento bacteriano, estimulando assim, o reparo tecidual (PEREIRA et al, 2009).

O tratamento endodôntico tem por objetivo a limpeza e a modelagem de todo o sistema de canais radiculares, buscando acabar com a infecção, por meio de soluções irrigadoras e medicações intracanaís adequadas, para se conquistar uma obturação efetiva (ALBUQUERQUE; DINIZ; MATHEUS, 1999).

O hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ habitualmente chamado de cal hidratada, cal apagada ou cal extinta é uma base inorgânica forte de pH 12,8, formada pela ligação de um cátion Ca^{2+} com dois ânions OH^- . Em condições ambientes, apresenta-se no estado sólido, com coloração branca e pouco solúvel em água (ESTRELA; PÉCORA, 1997).

O hidróxido de cálcio foi introduzido na Odontologia, em 1920 por Herman que procurava um medicamento com benefícios de um anti-séptico forte, para o tratamento biológico da polpa e preenchimento dos condutos radiculares. Desde então a ação biológica estabelecida por criar um ambiente favorável para a reparação tecidual, tem sido comumente procurado (LIMA; FAVA; SIQUEIRA, 2001).

Dentre as medicações intracanaís empregadas, um dos métodos utilizados é a neutralização do meio por intermédio do hidróxido de cálcio. O $Ca(OH)_2$ atua pela ionização de seus componentes, de modo a liberar cátions cálcio e ânions hidroxila, tornando o pH do meio básico. Num quadro de inflamação o pH do meio é ácido e a adição de uma base, bloqueia a ação de enzimas e de outros componentes celulares bacterianos (PEREIRA et al, 2009).

De acordo com Lopes e Siqueira (1999), a alcalinização promovida pelos íons hidroxila estimula a desnaturalização das enzimas mediante a quebra de ligações iônicas, ocasionando perda de atividade biológica e, por conseguinte a morte celular.

Segundo Safavi e Nichols (1994), o hidróxido de cálcio tem a capacidade de hidrolisar a porção lipídica do lipopolissacarídeo bacteriano, promovendo sua degradação. Os íons hidroxila removem átomos de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados formando um radical lipídico livre, o qual reage com oxigênio, transformando-se em peróxido. Essas mudanças incessantes levam a constituição de uma cadeia autocatalítica, no qual a carência de ácidos graxos insaturados resulta na perda da integridade da membrana citoplasmática, ocasionando a morte da célula.

Para Estrela (1999), ocorrem danos ao DNA da célula bacteriana quando íons hidroxila se ligam a fita, que lavam a inibição na replicação e desorganização da atividade celular.

As medicações a base de hidróxido de cálcio possuem consideráveis propriedades favoráveis, tais como ação anti-inflamatória e antimicrobiana, biocompatibilidade, estimular a formação de tecidos ósseos mineralizados e auxiliar no processo do reparo tecidual. Tais características se devem ao seu elevado pH (MANIGLIA et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e a morfologia de células de fibroblastos 3T3, tratadas com medicação intracanal de hidróxido de cálcio.

2 Material e Métodos

Equipamentos: Balança analítica Boeco Germany max 210g d=0,1mg, Banho-Maria Fanem mod 100, Câmara de Fluxo Laminar VECO Bio seg 09, Centrífuga MPW high speed brushless centrifuge MPW-350R, Estufa de CO2 Shel lab mod 5115, Estufa para esterilização e secagem Nevoni mod 1.3, Leitor de Microplacas Biotek EL 800, Micropipetas Labmate 20-200µL e Peguepet 100-1000µL e ponteiros, Microscópio de fase invertido Medilux N.A. 0.3, Microscópios Taimim TM 212 e Bioval Llooa e Pipetador automático.

Reagentes: Álcool 70%, Amostras diluídas de Hidróxido de Cálcio [Ca(OH)₂], Azul de Tripán, Citrato de Sódio 50%, Meio RPMI-1640 tamponado, Metanol, Solução Cristal Violeta 0,2% em etanol 2%, Solução de antibióticos Penicilina/ Estreptomicina (PS), Soro Fetal Bovino (SFB), Tampão de Fosfato e Cloreto de Sódio (PBS) e Tripsina 0,5 %.

Insumos: Câmara de Neubauer, Garrafas de cultura, Gaze, Pipeta Pasteur, Pipetas graduadas de 5 mL e 10 mL estéreis, Placa de 96 poços, Suporte para tubos de ensaio e Tubos Falcon.

2.1 Contagem celular pelo método do Azul de Tripán

Para a realização do estudo, primeiramente efetuou-se a contagem das populações celulares de fibroblastos presentes em uma das garrafas de cultura (adquiridas da Universidade Federal do Paraná-UFPR), utilizando o método por exclusão do Azul de Tripán, e contagem em Câmara de Neubauer.

Foi preparado um tubo falcon com 10 mL de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e 100µL de antibióticos, ao qual foram adicionadas as células e centrifugado por 10 minutos. Após este procedimento, a amostra foi concentrada para 1 mL, da qual foi removida uma alíquota de 10 µL e acrescentado 10 µL de Azul de Tripán que, posteriormente, foi colocado na Câmara de Neubauer. A concentração total de células na suspensão foi calculada conforme apresentada a figura 1.

$$n^{\circ} \text{ de células/ mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

FIGURA 1 – Fórmula para calcular o número de células
FONTE: Gorjão, 2005.



2.2 Tratamento das células 3T3 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Para efetuar o teste foram utilizadas microplacas (96 poços) e placas de 06 poços contendo lamínulas circulares estéreis, sendo assim preparado meio de cultura a 10% com aproximadamente 600.000 células. Em sequência, as células foram plaqueadas e incubadas na estufa de CO_2 (5%) a 37°C até sua adesão na placa. A solução estoque de hidróxido de cálcio uso odontológico foi preparada conforme seu método de manipulação. Foi pesado 150 mg do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e espatulado em solução fisiológica estéril, para posteriormente ser diluído em 3 mL de meio de cultivo. O material foi filtrado em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ e submetido à diluição seriada em meio de cultivo.

As células depois de aderidas tiveram seu meio aspirado e foram tratadas em triplicata com a solução estoque de hidróxido de cálcio e suas diluições (0,1; 0,01; 0,001 e 0,0001) e somente com o meio de cultura para controle do experimento.

2.3 Análise da viabilidade celular do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pelo método Cristal Violeta

Após o intervalo de 24 horas, foi realizada a avaliação da viabilidade celular através do método Cristal Violeta. Previamente foram adicionados às células 100 μL de metanol, o qual realizou fixação das células viáveis na placa. Logo em seguida, foi acrescentado 50 μL de solução de cristal violeta 0,2% em etanol 2%, que tem por função corar as células, e então se lavou a placa com tampão PBS. Por último colocou-se 200 μL de citrato de sódio 50%, e assim a placa foi encaminhada a um leitor de microplacas com filtro 590 nm, o qual determinou a medida da absorbância.

Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem em relação à absorbância determinada nos poços de células de controle.

2.4 Análise de morfologia e viabilidade celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A placa de 06 poços foi submetida a procedimento de fixação com glutaraldeído e desidratação em concentrações crescentes de etanol, em seguida foi enviada para a Universidade Estadual de Ponta Grossa onde, após submetida à metalização, as células foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura em microscópio Shimadzu, Kyoto, Japão.

3 Resultados e Discussão

O método do Azul de Tripán utilizado na contagem celular é conhecido como método de exclusão, pois as células mortas não possuem a capacidade de eliminar o corante absorvido, o qual cora seu citoplasma. Ao realizar a contagem celular na câmara de Neubauer foi apresentando um total de 2.000.000 células viáveis/mL, onde o número de células quantificados no quadrante central foi de 100 e o fator de diluição igual a 2.

Após realizar o método do Cristal Violeta os poços apresentaram diferentes colorações a olho nú, como apresenta a figura 2.

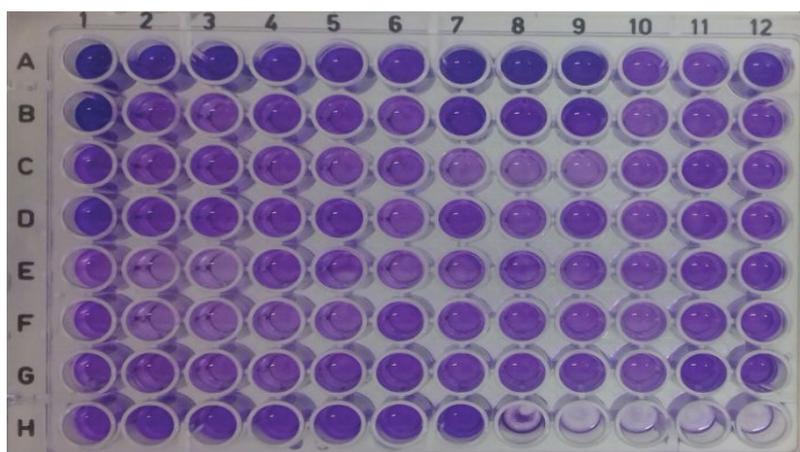


FIGURA 2 - Placa de 96 poços corada pelo método do Cristal Violeta

De acordo com a figura 2 diversos tons de violeta foram expostos, no qual o mais escuro apresenta maior quantidade de células vivas e a mais clara com a menor quantidade. Isso ocorre, pois as células vivas possuem a capacidade de absorver o corante que irá se intercalar entre suas fitas de DNA, ocorrendo assim à coloração de seu núcleo.

O resultado estatístico de viabilidade celular e desvio-padrão está exposto no gráfico 1.

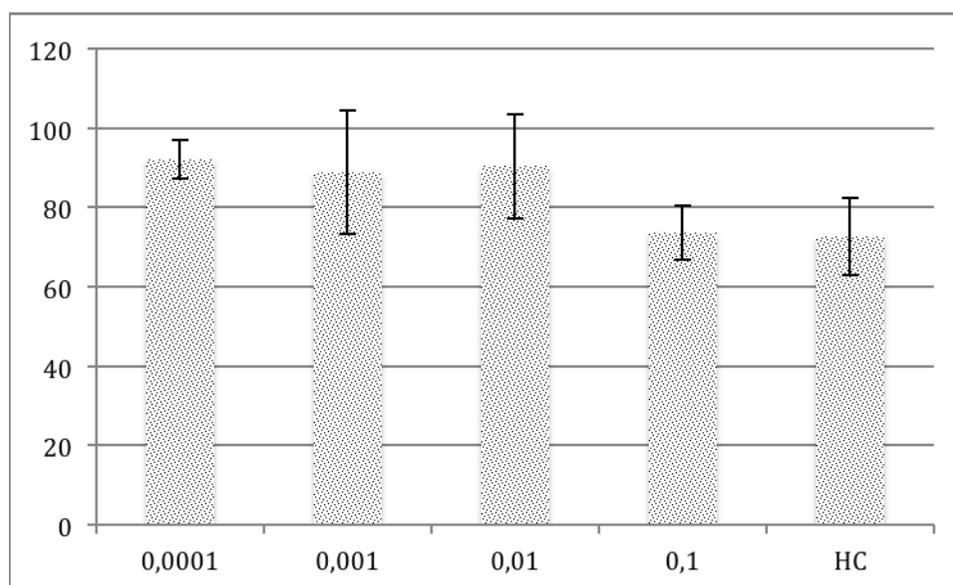


GRÁFICO 1 – Viabilidade celular (%) de fibroblastos 3T3 sob diferentes concentrações de Ca(OH)₂

De acordo com o gráfico 1, pelo método do cristal violeta, mesmo a mais alta concentração do tratamento, solução estoque (HC), não alterou significativamente a viabilidade celular, comparado



ao grupo controle. Estes resultados foram condizentes com a análise da morfologia celular por MEV (Figura 3).

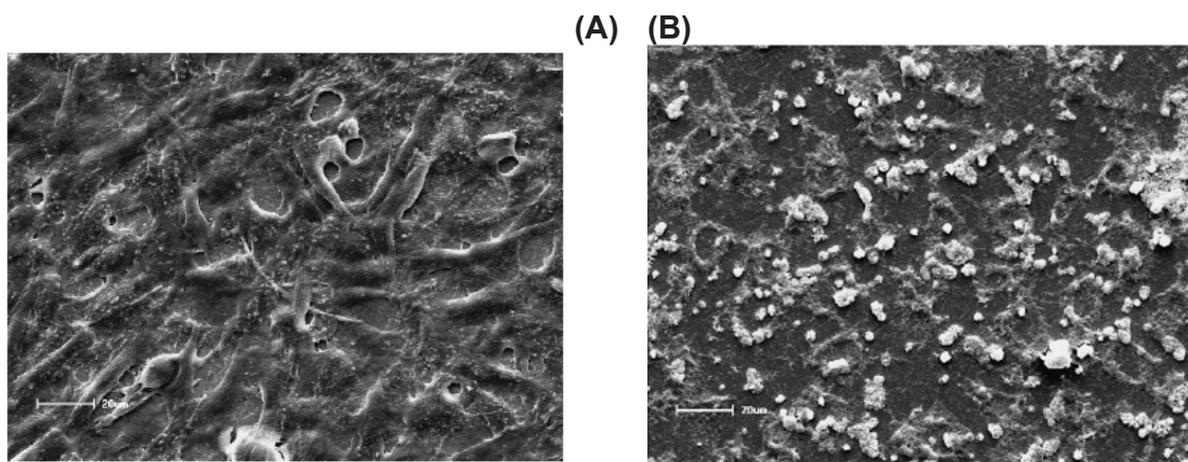


FIGURA 3 – Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das células de fibroblastos 3T3 tratadas somente com meio de cultivo (A) e tratadas com Ca(OH)_2 (B)

Mesmo com aparente presença de material particulado de Ca(OH)_2 sobre as células tratadas com a solução estoque de Ca(OH)_2 (B), quando comparado ao grupo controle (A), as características morfológicas das células de fibroblastos, como seus prolongamentos citoplasmáticos, seu formato fusiforme e confluência podem ser observadas, dando indícios de que houve discreta toxicidade celular, ainda que na concentração mais alta em estudo. Este resultado pode ser correlacionado aos valores encontrados de citotoxicidade que variaram de 72,7 a 92,2%.

Conclusão

O presente estudo evidência que a medicação intracanal à base de hidróxido de sódio apresentou discreta toxicidade em células de fibroblastos 3T3 a partir da concentração de 5 mg/mL, sendo que em concentrações abaixo de 5 mg/mL a viabilidade celular foi comparável ao controle.

Referências

ALBUQUERQUE, D. S.; DINIZ, A. S.; MATHEUS, T. C. U. Considerações clínicas sobre a microbiota endodôntica. *Revista do Conselho Regional de Odontologia de Pernambuco*. V.41, n.2, p.102-107, Out., 1999.

ESTRELA, C.; PÉCORRA, J. D. Características Químicas do Hidróxido de Cálcio. Universidade de São Paulo – USP. Novembro de 1997. Disponível em: <http://143.107.206.201/restauradora/calcio/quimica.htm>. Acesso em: 28/06/2016.

_____. Mecanismo de Ação do Hidróxido de cálcio. Universidade de São Paulo – USP. Novembro de 1997. Disponível em: <http://143.107.206.201/restauradora/calcio/mecan.htm>. Acesso em 28/06/2016.



LIMA, K.C.; FAVA, L. R. G.; SIQUEIRA JR.; J.F. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *Journal of Endodontics*. V.27, n.10, p. 616-619, Oct., 2001.

LOPES HP, SIQUEIRA-JUNIOR JF. *Endodontia- Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 1999.

MANIGLIA, C. A. G. et al. Dissociação iônica de medicações intracanaís experimentais à base de hidróxido de cálcio. *Jornal Brasileiro de Endodontia*. V.4, n.12, p.31-37, 2003.

PEREIRA, L., et al. Avaliação do pH de substâncias utilizadas como medicação intracanal em diferentes veículos. *Revista Sul- Brasileira de Odontologia*, 2009. Disponível em: file:///C:/Users/MASTER/Downloads/Artigo_3_Avaliacao_do_pH_de_substanciasutilizadas_como.pdf. Acesso em 28/06/2016.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *U.S National Library of Medicine*. V.20, n.3, p.127-129, March 1994.