

Citotoxicidade de um monômero metacrilato inibidor de metaloproteinasas com potencial uso na formulação de adesivos odontológicos

FERRÚA, Camila Perelló

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

CARVALHO, Rodrigo Varella de

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

OGLIARI, Fabrício Aulo

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

PIVA, Evandro

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

DEMARCO, Flávio Fernando

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos atuais apresentam uma alta resistência de união quando avaliados imediatamente após a realização da hibridização. Porém, evidências de degradação morfológica e mecânica, já podem ser observadas após 3 meses de avaliação *in vivo* (DE MUNCK et al, 2005). A principal causa da diminuição da durabilidade das restaurações adesivas está ligada à degradação hidrolítica dos componentes da interface de união, o sistema adesivo e o colágeno dentinário (DE MUNCK et al, 2005).

A presença de enzimas, as metaloproteinasas da matriz extracelular (MMPs), tem sido associada à degradação do colágeno constituinte da interface adesiva (PASHLEY et al, 2004). As MMPs são uma classe de endopeptidases zinco e cálcio dependente encontradas em diversas regiões do organismo (TJARDEHANE et al, 1998). Essas enzimas são responsáveis pela degradação de diferentes tipos de colágeno (MASKOS e BODE, 2003) e são responsáveis pelo desarranjo e remodelamento fisiológico da matrix extracelular em vários tecidos, incluindo dental (MASKOS e BODE, 2003). Foi demonstrado que os odontoblastos, células específicas da dentina humana, são capazes de sintetizar MMP 2 e 9 (DE LAS HERAS et al, 2000), o que pode potencializar a degradação da matriz orgânica mineralizada em dentes afetados por cárie. A atividade proteolítica dessas enzimas é regulada através de inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs) presentes no organismo (GOMIS-RUTH et al, 1997) e o desequilíbrio entre os TIMPs e as MMPs inicia a degradação de colágeno.

Cimentos à base de Óxido de Zinco (SANTOS et al, 2004), sais metálicos como $ZnSO_4$ e $CuSO_4$ (SOUZA et al, 1999) e amálgamas odontológicos contendo Zn (SOUZA et al, 2000) demonstraram alto poder de inibição das MMPs. Além disso, a clorexidina (CHX) tem demonstrado sua atividade na inibição das MMPs (PASHLEY et al, 1995). Por isso, a aplicação deste anti-séptico após o condicionamento ácido da dentina vem sendo amplamente estudada como uma alternativa para aumentar a longevidade das restaurações adesivas. CARRILHO et al, (2007), sugerem que a aplicação de CHX 2% após o condicionamento, *in vitro*, pode ser útil para a manutenção da resistência de união. Também é sugerido que a aplicação de CHX 2%, *in vivo*, pode estar associada à manutenção da camada híbrida após 6 (BRACKETT et al, 2007) e 14 meses (CARRILHO et al, 2007) da realização da hibridização. A inclusão de monômeros como o metacrilato de zinco,

que possui o metal zinco, um poderoso inibidor de MMPs parece ser uma alternativa promissora para a manutenção da camada híbrida. A possibilidade de copolimerização desses monômeros com outros tradicionalmente presentes na composição dos sistemas adesivos pode garantir uma maior estabilidade da inibição quando comparada com a promovida pela CHX, que não interage com os monômeros metacrilatos. Nesse sentido, o metacrilato de zinco é um monômero de grande interesse para a formulação de adesivos odontológicos, pois a presença de zinco na sua composição sugere uma possível inibição das MMPs.

Monômeros metacrilatos que fazem parte da formulação dos materiais restauradores resinosos são sabidamente produtos citotóxicos em contato com células em cultivo (SCHWEIKL & SPAGNUOLO et al, 2006). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi comparar a citotoxicidade do metacrilato de zinco com o HEMA (2-hidroxietil metacrilato) um monômero amplamente utilizado na formulação dos sistemas adesivos atuais.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Fibroblastos 3T3 de camundongos foram cultivados em meio 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 CO₂ com controle de temperatura e pressão, em ambiente úmido a 37°C, 95% de ar e 5% de CO₂. Quando as células atingiram a subconfluência, 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 e 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 DMEM suplementado com 10% de SFB e então realizada a homogeneização do conteúdo. Então foram retirados 20 µL da solução para a contagem das células em Câmara de Neubauer. Após a contagem, foram semeadas 1x10⁴ células por poço da placa de 96 poços. Então, a placa foi levada a estufa por 24h para a adesão das células.

Foram testados dois monômeros, o Metacrilato de Zinco (MZ) e o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). A distribuição dos grupos foi realizada de acordo com a Figura 1. Para cada monômero foram realizadas diluições fracionadas de 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 mM.

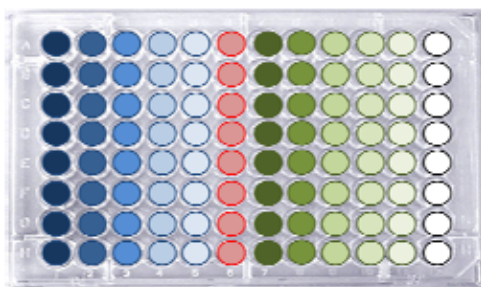


Figura 1. Demonstração da forma de divisão dos grupos na placa de 96 poços. Os poços na cor azul representam o HEMA em suas diferentes diluições. Já os poços em verde representam as diluições do metacrilato de zinco. Em vermelho estão representados os poços usados para controle (células sem produto teste) e em branco estão os poços com meio e sem células.

As soluções foram colocadas em contato com as células por 24h em ambiente controlado (37°C, 5% CO₂). 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 CO₂. Após 4 horas de incubação das células com a mistura a base de MTT na estufa de CO₂, o conteúdo dos poços foi retirado e foram adicionados 200 µL de DMSO em cada poço. 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). Por último, a placa foi levada ao espectrofotômetro e lida em um comprimento de onda de 540 nm para avaliação da viabilidade celular. Os resultados foram submetidos a análise estatística não-paramétrica com Kruskal-Wallis e teste complementar de Dunn ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a análise dos resultados foi possível observar que o monômero metacrilato de zinco apresentou citotoxicidade maior que o monômero 2-hidroxietil metacrilato (Figura 2).

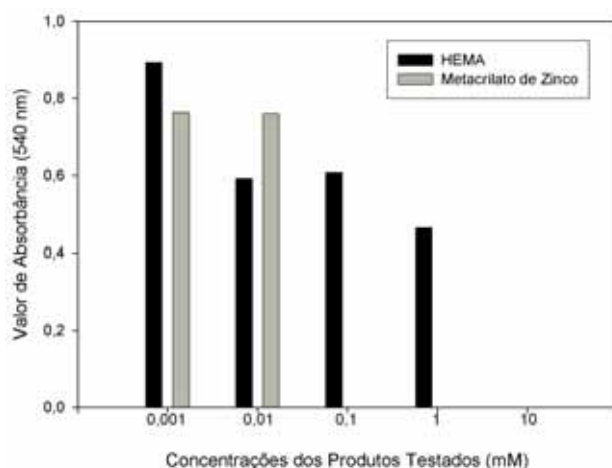


Figura 2. Gráfico de barras demonstrando a citotoxicidade dos dois monômeros testados. É possível observar que o metacrilato de zinco foi mais tóxico que o HEMA. Já na concentração de 0,1 mM o metacrilato de zinco causou morte de todas as células.

Com base na análise da Figura 2 pode-se observar que para os dois monômeros testados o valor de absorbância (viabilidade celular) diminuiu de acordo com o aumento da concentração dos produtos. O grupo controle (sem a adição de produto-teste) foi o que obteve maior valor de absorbância, enquanto o grupo branco (poços com meio e sem células) não fez a conversão do MTT em cristais de formazan (dados não exibidos).

O HEMA é comumente identificado como componente dissolúvel dos materiais resinosos (SAMUELSEN et al, 2007). E assim como outros monômeros resinosos tem sido identificado como citotóxico por vários tipos de metodologias, todas indicando modificações na estrutura básica das células como integridade da membrana celular e funções celulares como atividade enzimática ou a síntese de macromoléculas (SCHWEIKL & HARTMANN et al, 2006). Por isso, o HEMA foi utilizado como monômero padrão para a comparação da citotoxicidade do metacrilato de zinco.

Recentemente monômeros resinosos têm sido identificados como agentes químicos capazes de quebrar a estabilidade da balança redox da célula, resultando em um aumento nos níveis de oxigênio reativo (ROS), levando a subsequente morte celular via apoptose. Além disso, elevados níveis de ROS são agentes candidatos para a mediação de efeitos genotóxicos, já que a genotoxicidade dos monômeros TEGDMA e HEMA tem sido repetidamente demonstrado em estudos in vitro (SCHWEIKL & SPAGNUOLO et al, 2006).

4 CONCLUSÕES

O metacrilato de zinco demonstrou ser um monômero mais citotóxico que o HEMA, no entanto outros estudos devem ser realizados para a sua avaliação na forma polimerizada dentro de um sistema adesivo experimental. Assim como, estudos do efeito do metacrilato de zinco em cobaias podem dar respostas mais próximas das obtidas nos humanos.

5 REFERÊNCIAS

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.

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. **J Dent Res**, v.83, n.3, p.216-21, 2004.

MASKOS, K.; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Mol Biotechnol**, v.25, n.3, p.241-66, 2003.

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.

GOMIS-RÜTH, F.X.; MASKOS, K.; BETZ, M.; BERGNER, A.; HUBER, R.; SUZUKI, K.; YOSHIDA, N.; NAGASE, H.; BREW, K.; BOURENKOV, G.P.; BARTUNIK, H.; BODE, W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. **Nature**, v.389, n.6646, p.77-81, 1997.

SANTOS MC, DE SOUZA AP, GERLACH RF, TREVILATTO PC, SCAREL- CAMINAGA RM, LINE SR. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **J Oral Rehab**, v.31, n.7, p.660-4, 2004.

SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, v.22, n.14, p. 2025-30, 2001.

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. **J Dent Res**, v.86, n.6, p.529-33, 2007.

BRACKETT, W.W.; TAY, F.R.; BRACKETT, M.G.; DIB, A.; SWORD, R.J.; PASHLEY, D.H. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. **Oper Dent**, v.32, n. 2, p. 107-1, 2007.

SAMUELSEN, J.T.; DAHL, J.E.; KARLSSON, S.; MORISBAK, E.; BECHER, R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. **Dent Mater**, v.23, n.1, p.34-9, 2007.

SPAGNUOLO, G.; D'ANTÒ, V.; COSENTINO, C.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H.; RENGO, S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. **Biomaterials**, v.27, n.9, p.1803-9, 2006.

SCHWEIKL, H.; ALTMANNBERGER, I.; HANSER, N.; HILLER, K.A.; BOLAY, C.; BROCKHOFF, G.; SPAGNUOLO, G.; GALLER, K.; SCHMALZ, G. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. **Biomaterials**. v.26, n.19, p.4111-8, 2005.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **J Dent Res**, v.85, n.10, p.870-7, 2006.