

UNIVERSIDADE PAULISTA

FABIANA DUBAU CAVALLARO MOTA

**TOXICIDADE DE MONÔMEROS FUNCIONAIS E SUA INFLUÊNCIA
NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS POR
CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

SÃO PAULO

2024

FABIANA DUBAU CAVALLARO MOTA

**TOXICIDADE DE MONÔMEROS FUNCIONAIS E SUA INFLUÊNCIA
NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS POR
CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação do Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima.

SÃO PAULO

2024

Mota, Fabiana Dubau Cavallaro.

Toxicidade dos monômeros funcionais e sua influência na liberação de citocinas inflamatórias pelas células pulpárias humanas / Fabiana Dubau Cavallaro Mota. - 2024.

12 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Carleto Andia.

1.10-MDP. 2. GPDM. 3. Mediadores. I. Lima, Adriano Fonseca de (orientador). II. Andia, Denise Carleto (coorientadora).

III. Título.

FABIANA DUBAU CAVALLARO MOTA

**TOXICIDADE DE MONÔMEROS FUNCIONAIS E SUA INFLUÊNCIA
NA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS POR
CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima – Orientador
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof.^a Dr.^a Bruna Marin Fronza
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Diogo Bonazzi Dressano
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

DEDICATÓRIA

Dedico este Projeto de Pesquisa *Stricto Sensu* em Odontologia – Mestrado à Deus, por permitir que esse sonho se realizasse e ao meu pai, **José Luiz Cavallaro** (*in memoriam*), que me ensinou a ser uma pessoa inquieta, que nunca se acomoda na mediocridade da vida, buscando sempre ser um ser humano e uma profissional melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Universidade Paulista – UNIP**, especificamente o Programa de Pós – Graduação, por proporcionar a realização desse projeto de pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela bolsa concedida para a realização desse Projeto de Pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima**, meu orientador, por acreditar no meu sonho e me encaminhar na vida acadêmica com segurança, profissionalismo e competência.

A todos os professores do **Programa de Pós- Graduação da UNIP**, com os quais pude extrair muito conhecimento e me tornar uma profissional muito mais completa.

Agradecimento aos meus colegas de mestrado que tive o prazer de conhecer e dividir tantos momentos juntos, especialmente ao amigo, **Wagner dos Santos e Santos**, que foi um apoio fundamental nesses dois anos.

Agradecimento especial aos meus familiares, meu marido **Paulo Henrique da Silva Mota**, à minha mãe **Marcia da Silva Dubau Cavallaro** e minha madrinha **Rosângela Dubau Cerveira**, que estiveram presentes nessa minha jornada, me apoiando e torcendo sempre para o meu sucesso. Vocês foram fundamentais para a conclusão dessa etapa tão importante na minha vida.

Agradeço imensamente à minha sócia, **Daniela Resende Dutra**, que foi muito parceira me dando apoio para conciliar o projeto dos sonhos e o início de um consultório.

E a **todos** que não foram nomeados, mas que fizeram parte da minha formação e da realização desse Projeto de Pesquisa.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de monômeros funcionais em células da polpa dental humana (CPDH). Para isso, CPDH foram isoladas de terceiros molares humanos saudáveis. Os monômeros 10-metacrilóiloxidecil dihidrogenofosfato (10-MDP) e glicerofosfato dimetacrilato (GPDM) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter diferentes concentrações. CPDH (10×10^4 células por poço) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por dois dias. As células foram então expostas às diferentes concentrações dos monômeros diluídos em meio de cultura por 24 horas. Após esse período, a viabilidade celular foi analisada utilizando o reagente metiltetrazolium (MTT) e o tipo de morte celular foi avaliado por citometria de fluxo. Os dados foram tabulados e analisados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) de um critério. Os resultados mostraram que baixas concentrações de MDP e GPDM não causaram redução significativa na viabilidade celular. No entanto, a concentração de 3 mM de 10-MDP resultou em uma redução de aproximadamente 50% na viabilidade celular, enquanto o GPDM, mesmo na concentração de 4 mM, causou apenas uma redução discreta (20%). As citocinas foram avaliadas através da plataforma MAGPIX e ambos os monômeros influenciaram a liberação das citocinas inflamatórias analisadas, com variações na quantidade desses mediadores. Pode-se concluir que o aumento na concentração dos monômeros 10-MDP e GPDM pode influenciar a viabilidade celular. O 10-MDP apresentou uma toxicidade mais acentuada que o GPDM, com uma redução significativa da viabilidade celular (<50%) na concentração de 3 mM. Observou-se um leve aumento na morte celular em concentrações mais altas (3 mM para MDP, 4 mM para GPDM), sendo a morte predominantemente por apoptose, sem um aumento significativo de necrose. Além disso, os monômeros afetaram a liberação de citocinas inflamatórias pelas células pulpares, com essa influência sendo dependente do material utilizado.

Palavras-chave: 10-MDP. GPDM. Mediadores.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of functional monomers on human dental pulp cells (HDPCs). To achieve this, HDPCs were isolated from healthy human third molars. The monomers 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (10-MDP) and glycerophosphate dimethacrylate (GPDM) were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain different concentrations. HDPCs (10×10^4 cells per well) were seeded in 24-well plates and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for two days. The cells were then exposed to different concentrations of the monomers diluted in a culture medium for 24 hours. After this period, cell viability was analysed using the methyl tetrazolium (MTT) reagent, and the type of cell death was evaluated by flow cytometry. The data were tabulated and analysed using one-way Analysis of Variance (ANOVA). The monomers were not compared to each other. The results showed that low concentrations of MDP and GPDM did not cause a significant reduction in cell viability. However, the concentration of 3 mM of 10-MDP resulted in approximately a 50% reduction in cell viability, while GPDM, even at 4 mM, caused only a slight reduction (20%). The cytokines were evaluated through MAGPIX assay, and both monomers influenced the release of the inflammatory cytokines analysed, with variations in the number of these mediators. It can be concluded that increasing the concentration of the monomers 10-MDP and GPDM can influence cell viability. The 10-MDP monomer exhibited more pronounced toxicity than the GPDM monomer, with a significant reduction in cell viability (<50%) at a 3 mM concentration. A slight increase in cell death was observed at higher concentrations (3 mM for MDP, 4 mM for GPDM), with the death occurring mainly through apoptosis and no significant increase in necrosis. Additionally, the monomers affected the release of inflammatory cytokines by pulp cells, with this influence being material-dependent.

Key-words: 10-MDP. GPDM. Mediators.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 CONCLUSÕES GERAIS	10
REFERÊNCIAS	11

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos são amplamente empregados na odontologia devido à sua capacidade de promover a união e a manutenção de restaurações, mesmo em áreas de difícil acesso, facilitando a prática restauradora minimamente invasiva. Estes sistemas demonstram uma boa resistência de união ao esmalte e à dentina (Fabiao et al., 2015; Fu et al., 2017; McLean et al., 2015). Existem duas técnicas principais utilizados pelos sistemas adesivos para unir-se à estrutura dental: o condicionamento total e o autocondicionante. No método de condicionamento total, é essencial o uso de ácido para condicionar o esmalte e a dentina antes da aplicação do sistema adesivo. Este processo permite uma melhor difusão e embricamento mecânico do adesivo na superfície do dente (Pashley et al., 2011; Reis et al., 2010). Por outro lado, o método autocondicionante utiliza primers que contêm monômeros funcionais capazes de realizar o condicionamento e a difusão dos agentes adesivos diretamente na estrutura dental, além de formar uma união química com a mesma, eliminando a necessidade de um pré-condicionamento ácido na dentina (Lima et al., 2012; Pimenta de Araujo et al., 2014; Van Meerbeek et al., 2011). Atualmente, os adesivos multimodo ou universais estão disponíveis no mercado. Esses adesivos combinam características dos métodos de condicionamento total e autocondicionante, permitindo flexibilidade na aplicação. No entanto, não introduzem novos mecanismos de união, mas sim, oferecem a versatilidade de serem utilizados conforme a necessidade clínica (Antoniuzzi et al., 2016; Fu et al., 2017; Suzuki et al., 2016).

Monômeros funcionais que facilitam a união química entre o sistema adesivo e a estrutura dental são encontrados tanto nos adesivos autocondicionantes quanto nos universais. Entre os mais utilizados estão o 10-metacrilóiloxidecil dihidrogenofosfato (10-MDP) e o glicerofosfato dimetacrilato (GPDM). Esses monômeros não apenas se ligam ao cálcio presente no esmalte e na dentina, mas também promovem uma leve desmineralização superficial dessas áreas. Esse efeito melhora a difusão do agente adesivo pelo esmalte e pela dentina, resultando na formação de uma camada híbrida que reforça a adesão. (Fukeygawa et al., 2006; Van Landuyt et al., 2008; Yoshida et al., 2004; Yoshihara et al., 2011).

Estudos *in vitro* (Costa et al., 1999; Hanks et al., 1991; Lanza et al., 2008; Rathbun et al., 1991) e *in vivo* (Costa et al., 2000a; Costa et al., 2000b; Costa et al., 2003; de Souza Costa et al., 2001; de Souza Costa et al., 2007; Hebling; Giro; Costa,

1999a; 1999b) demonstram a toxicidade dos sistemas adesivos, mas ainda há lacunas no entendimento sobre o impacto específico dos monômeros funcionais nas células pulpares. Embora seja amplamente reconhecida a toxicidade dos agentes adesivos na polpa dentária, a influência direta desses monômeros nas células pulpares permanece pouco explorada.

Recentemente, uma pesquisa investigou os efeitos do 10-MDP em células pulpares imortalizadas, revelando que baixas concentrações desse monômero podem prejudicar a diferenciação em células odontoblásticas (Kim et al., 2015). O estudo também indicou que o 10-MDP pode aumentar a expressão de RNAm de citocinas inflamatórias. Contudo, a pesquisa não abordou se essa toxicidade leva a uma maior liberação dessas citocinas no ambiente, o que poderia iniciar um processo inflamatório após a exposição a pequenas quantidades do monômero, comprometendo, assim, o sucesso do tratamento restaurador.

Desta maneira, os objetivos do presente estudo são avaliar a influência de diferentes concentrações dos monômeros funcionais 10-MDP e GDMA-P na viabilidade de células da polpa dental humana (CPDH), e na liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) por estas células.

2 CONCLUSÕES GERAIS

Os monômeros funcionais, como o 10-MDP e o GPDM, desempenham papéis cruciais nos sistemas adesivos autocondicionantes e universais, bem como nos cimentos autoadesivos. Quando aplicados diretamente na dentina, esses monômeros podem se difundir pelos túbulos dentinários e alcançar o tecido pulpar, potencialmente causando danos. Os resultados deste estudo mostraram que os monômeros funcionais apresentam toxicidade reduzida às células mesenquimais da polpa dental humana, com mínima influência no metabolismo celular, especialmente no caso do GPDM. No entanto, o GPDM provocou uma liberação significativa de citocinas inflamatórias por essas células, sugerindo que este material pode iniciar um processo inflamatório no tecido pulpar. Em contraste, embora o 10-MDP tenha mostrado uma influência mais negativa no metabolismo celular, ele teve pouca influência na liberação de citocinas pelas células mesenquimais da polpa dental.

REFERÊNCIAS

Antoniuzzi BF, Nicoloso GF, Lenzi TL, Soares FZ, Rocha Rde O. Selective acid etching improves the bond strength of universal adhesive to sound and demineralized enamel of primary teeth. *J Adhes Dent*. 2016;18(4):311-316.

Costa CA, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent*. 2000a;13(2):81-87.

Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J*. 2003;36(12):831-839.

Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. 2000b. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod*. 26(9):512-516.

Costa CA, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line mdpc-23. *Dent Mater*. 1999;15(6):434-441.

de Souza Costa CA, Lopes do Nascimento AB, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater*. 2001;17(3):230-240.

de Souza Costa CA, Teixeira HM, Lopes do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of resin-based dental materials applied as liners in deep cavities prepared in human teeth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;81(1):175-184.

Fabiao MD, Stape THS, Yanikian CRF, de Lima AF, Pizi ECG, Baron GMM, et al. Influence of different adhesive protocols on ceramic bond strength and degree of conversion of resin cements. *Int J Adhes Adhes*. 2015;62:7-13.

Fu J, Saikaew P, Kawano S, Carvalho RM, Hannig M, Sano H, et al. Effect of air-blowing duration on the bond strength of current one-step adhesives to dentin. *Dent Mater*. 2017;33(8):895-903.

Fukegawa D, Hayakawa S, Yoshida Y, Suzuki K, Osaka A, Van Meerbeek B. Chemical interaction of phosphoric acid ester with hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2006;85(10):941-944.

Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*. 1991;70(11):1450-1455.

Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod*. 1999a;25(10):676-682.

Hebling J, Giro EM, Costa CA. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent*. 1999b;27(8):557-564.

Kim EC, Park H, Lee SI, Kim SY. Effect of the acidic dental resin monomer 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate on odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;117(5):340-349.

Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*. 2008;25(6):533-43.

Lima AF, da Silva VB, Soares GP, Marchi GM, Baggio Aguiar FH, et al. Influence of previous acid etching on interface morphology and bond strength of self-etching adhesive to cavosurface enamel. *Eur J Dent*. 2012;6(1):56-62.

McLean DE, Meyers EJ, Guillory VL, Vandewalle KS. Enamel Bond Strength of New Universal Adhesive Bonding Agents. *Oper Dent*. 2015;40(4):410-7.

Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1-16.

Pimenta de Araujo CT, Prieto LT, Lima AF, Souza-Junior EJ, Dias CT, Paulillo LA. Influence of photo-curing distance on bond strength and nanoleakage of self-etching adhesive bonds to enamel and dentin. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(2):113-119.

Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE. Cytotoxicity of a bis-gma dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(4):443-457.

Reis A, Ferreira SQ, Costa TR, Klein-Junior CA, Meier MM, Loguercio AD. Effects of increased exposure times of simplified etch-and-rinse adhesives on the degradation of resin-dentin bonds and quality of the polymer network. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(5):502-509.

Suzuki T, Takamizawa T, Barkmeier WW, Tsujimoto A, Endo H, Erickson RL, et al. Influence of etching mode on enamel bond durability of universal adhesive systems. *Oper Dent*. 2016;41(5):520-530.

Van Landuyt KL, Yoshida Y, Hirata I, Snauwaert J, De Munck J, Okazaki M, et al. Influence of the chemical structure of functional monomers on their adhesive performance. *Journal of Dental Research*. 2008;87(8):757-761.

Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):17-28.

Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res*. 2004;83(6):454-458.

Yoshihara K, Yoshida Y, Hayakawa S, Nagaoka N, Irie M, Ogawa T, et al. Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin. *Acta Biomaterialia*. 2011;7(8):3187-3195.