

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE
HIDROXIETIL-METACRILATO E DA PRESENÇA DE
SOLVENTE EM ADESIVOS SIMPLIFICADOS NA
VIABILIDADE CELULAR E NA LIBERAÇÃO DE
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS PULPARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

HELDER MASSARO

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE
HIDROXIETIL-METACRILATO E DA PRESENÇA DE
SOLVENTE EM ADESIVOS SIMPLIFICADOS NA
VIABILIDADE CELULAR E NA LIBERAÇÃO DE
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS PULPARES**

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

HELDER MASSARO

São Paulo

2019

Massaro, Helder.

Influência da concentração de hidroxietil-metacrilato e da presença de solvente em adesivos simplificados na viabilidade celular e na liberação de mediadores inflamatórios por células pulpares / Helder Massaro. - 2019.

14 f. : il. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima.

1. Solvente. 2. Concentrações. 3. Adesivos. 4. HEMA. I. Lima, Adriano Fonseca de (orientador). II. Título.

HELDER MASSARO

**INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE
HIDROXIETIL-METACRILATO E DA PRESENÇA DE
SOLVENTE EM ADESIVOS SIMPLIFICADOS NA
VIABILIDADE CELULAR E NA LIBERAÇÃO DE
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS PULPARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

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

_____/____/____
Prof.^a Dr.^a Cíntia Helena Coury Saraceni
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof.^a Dr.^a Flávia Pires Rodrigues
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado
Universidade de São Paulo – USP

_____/____/____
Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Maud Massaro (in memorian) e Zilda Palombo Massaro, pela educação, carinho, exemplo de vida, determinação e pelo esforço incondicional que fizeram na minha formação.

A Companheira que Deus me deu, minha amada esposa, Rebeca Bergamini de Andrade Massaro, meu porto seguro, minha maior incentivadora, amiga que sempre me apoiou, enalteceu meu valor e acreditou em mim, quando as vezes nem eu mesmo acreditava.

As minhas queridas filhas, Giovanna Andrade Massaro e Giulia Andrade Massaro, minha força de viver, presentes de Deus com as quais eu aprendi o que é o verdadeiro amor e tenho o privilégio e orgulho de viver.

Ao meu único irmão de sangue Herlon Massaro, que vários ensinamentos me deu, e a outros irmãos que a vida me concedeu.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, criador dos céus e da terra, que me deu a vida, e sem O qual nada seria possível.

Aos Professores Doutores: Abílio A. M. de Moura (in memorian), que me introduziu na endodontia, especialidade que exerço com amor e Manoel Eduardo de Lima Machado que me ensinou a ensinar e me ingressou na carreira acadêmica.

Ao meu orientador, o jovem Prof. Dr. Adriano Fonseca de Lima, que nunca mediu esforços para fazer deste projeto uma realidade, e sem o qual este trabalho não seria possível.

A equipe de Endodontia da FOUNIP: Prof.^a Dr.^a Lení Hamaoka, Prof. Dr. Fábio Strefezza, Prof.^a Dr.^a Camilla Carvalho, Prof. M.e Sérgio Meirelles e Prof. Dr. José Eduardo Rosseli, amigos que me receberam de braços abertos e deram oportunidade de fazer o que mais gosto que é ensinar.

Aos coordenadores do curso de graduação em odontologia da FOUNIP, Prof. Dr. Carlos Eduardo Alegretti e Prof. Dr. Elcio Magdalena Giovani, pelo apoio e incentivo.

A coordenadora do programa de Pós Graduação em Odontologia da FOUNIP Prof.^a Dr.^a Cintia H. C. Saraceni, que com maestria e competência desenvolve seu trabalho.

Aos comandantes do Centro Odontológico da Polícia Militar do Estado de São Paulo, Cel. Gilberto Correa dos Santos Neves, Tem. Cel. José Carlos Lago e Maj. Celso K. Ogata, que permitiram a conclusão desta tese, mesmo que por vezes tivesse que me ausentar das atividades diárias que exerço com orgulho neste local.

Aos antigos companheiros da disciplina de endodontia da UNICASTELO, Prof. Dr. Arlindo Di Spagna Souza, Prof.^a Dr.^a Maria Letícia de Brito Machado, Prof. Dr. Raul Capp Palotta, Prof. Fernando Quadros Zapparoli, Prof. Rodrigo Villagra e Prof.^a M.^a Lúcia Capellette, por termos formado uma equipe coesa onde muito se ensinou e se aprendeu.

A todos os meus alunos de graduação e pós graduação durante estes vinte e quatro anos de docência: a razão do meu aprimoramento profissional são vocês.

Enfim a todos os colegas de trabalho, indicadores, funcionários, parentes e pacientes que tanto me motivam a continuar na busca pelo melhor do ser humano, meu muito obrigado.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de adesivos solvatados e não-solvatados com diferentes concentrações de 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) sobre células da polpa dental humana. Para este fim, células foram isoladas da polpa dental de terceiros molares humanos hígidos. Sistemas adesivos experimentais, contendo ou não solvente (etanol 10%), foram manipulados com diferentes concentrações de HEMA (0%; 10%; 20%). As células pulpares foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Corpos-de-prova cilíndricos (5 mm de diâmetro, 1 mm de espessura) foram confeccionados e mantidos em contato com meio de cultura por 24 h. Após isso, o extrato obtido (meio de cultura + produtos liberados pelo sistema adesivo) foi aplicado sobre as células e mantido por um período de 6 h. Decorrido este período, o extrato foi removido, novo meio aplicado e após períodos de 12 e 24 h foi realizada a análise da viabilidade celular utilizando o reagente metiltetrazolium (MTT) e analisada a liberação de citocinas pelas células. Os dados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância a um critério ($\alpha=0,05$). Adesivos contendo HEMA tiveram toxicidade maior do que aqueles sem o monômero. No entanto, os adesivos contendo solvente reduziram significativamente a viabilidade das células pulpares nos dois períodos avaliados. A exposição aos adesivos aumentou a liberação de IL-6, IL-10 e TNF- α . Pode-se concluir que os adesivos experimentais simplificados avaliados que continham solvente foram mais tóxicos às células pulpares, e que a exposição aos agentes testados pode modular a liberação de citocinas inflamatórias por estas células.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Citocinas. Inflamação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of solvated and non-solvated adhesives containing different amounts of 2-hydroxyethyl-methacrylate (HEMA) on human dental pulp cells. Cells were obtained from dental pulp of human third molars. Experimental adhesive systems, with or without solvent (ethanol 10%), were prepared with different concentrations of HEMA (0%; 10%; 20%). The pulp cells were harvested on 6-wells plaques and incubated at 37°C and CO₂ at 5%. Cylindrical specimens (5 mm diameter, 1 mm thick) were prepared and maintained in contact with culture medium for 24 h. After this period, the extracts (culture medium + products released from adhesive systems) were applied to cells. After 6 h, the extracts were removed, a fresh culture medium was applied and after 12 and 24-h periods, the cell viability and cytokine release were analysed. The results were statistically analysed using one-way ANOVA. Adhesives containing HEMA presented higher toxicity than the ones without the monomer. The adhesives containing solvent reduced the cell viability of pulp cells on the evaluated period. The exposure to the adhesives increased the release of IL-6, IL-10, and TNF. It may be concluded that the evaluated experimental simplified adhesives with solvent were more toxic to pulp cells, and the exposure to the evaluated agents can modulate the cytokine release by such cells.

Keywords: Cytotoxicity. Cytokines. Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 CONCLUSÕES GERAIS.....	11
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	12

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas adesivos têm sido amplamente utilizados na odontologia restauradora. Tais sistemas, extensivamente estudados quanto às suas propriedades mecânicas [1-4], propiciam satisfatória resistência de união ao esmalte e dentina, assim como adequada capacidade de selamento de interfaces.

Sabe-se que os sistemas adesivos apresentam toxicidade, a qual foi demonstrada por diversos estudos *in vitro*, [5-8] e *in vivo* [9-13]. Dentre os monômeros utilizados nos sistemas adesivos, são três os amplamente analisados quanto à toxicidade celular: bisfenol-glicidil-dimetacrilato (Bis-GMA), tri-etilenoglicol-dimetacrilato (TEGDMA) e 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA). O Bis-GMA é o componente com maior toxicidade às células pulpares [14]. No entanto, devido à sua extensa cadeia e conseqüente alto peso molecular, não possui capacidade de difusão pelos túbulos dentinários. Por isso, sua toxicidade, apesar de alta, é mínima quando há uma barreira dentinária entre o procedimento restaurador e a câmara pulpar, não permitindo o contato com seu tecido.

O HEMA é um monômero de baixo peso molecular utilizado nos sistemas adesivos como um diluente [15, 16]. Este reduz a viscosidade do Bis-GMA, auxiliando na penetração do agente nas fibras colágenas expostas não só pelo aumento da fluidez do sistema, mas também devido à característica hidrófila de sua molécula [16]. Alguns estudos já demonstraram que o HEMA pode induzir um estado de estresse oxidativo devido ao aumento significativo na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) [17], ao aumento da expressão de COX-2 e de VEGF, eventos estes associados à sua toxicidade [18, 19].

A toxicidade dos agentes pode levar à redução da viabilidade das células, ou mesmo à necrose ou apoptose celular [20]. Além disso, os danos causados às células podem acarretar um processo inflamatório [12], que pode culminar, clinicamente, em hipersensibilidade pós-operatória ou até mesmo em uma pulpite irreversível. Este processo inflamatório é desencadeado e modulado pela liberação de mediadores inflamatórios [21]. Citocinas como IL-1 e TNF- α são responsáveis pela iniciação do processo inflamatório, além de estimularem a proliferação de células T e liberação de histamina pelos macrófagos [21, 22]. Além destas, o IL-6 é também uma importante citocina pró-inflamatória que promove a ativação e diferenciação de células T [22]. Além dos mediadores pró-inflamatórios, citocinas anti-inflamatórias têm o papel de

conter e modular a resposta tecidual frente à agressão gerada. O IL-10 é um importante mediador anti-inflamatório com a função de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos e também de inibir a formação de óxido nítrico, agente capaz de induzir a apoptose celular [21, 22]. A liberação destes mediadores após exposição aos monômeros lixiviados de agentes adesivos pode motivar o desenvolvimento de um processo inflamatório local decorrente da toxicidade gerada.

A liberação desses agentes pode ser promovida por células como odontoblastos, fibroblastos e macrófagos [23], células presentes no tecido pulpar e que podem servir como desencadeadores de uma reação inflamatória perante um dano causado por monômeros que se difundiram para este tecido durante um procedimento restaurador.

Isoladamente, os monômeros podem apresentar reações celulares específicas, já amplamente demonstradas na literatura [24-27]. Os trabalhos que avaliam a toxicidade de monômeros de forma isolada são importantes para que sejam descobertos e descritos os mecanismos de toxicidade dos agentes monoméricos em diferentes linhagens celulares. Todavia, os monômeros são utilizados combinados a outros componentes na forma de adesivos e resinas restauradoras. Durante a reação de polimerização, a copolimerização dos agentes, assim como aprisionamento dos monômeros não-reagidos dentro da trama polimérica, podem modificar a resposta das células perante os agentes, fazendo com que a toxicidade demonstrada nos monômeros isolados seja clinicamente irrelevante nos procedimentos odontológicos. Sendo assim, é importante que seja realizada a avaliação da toxicidade de sistemas adesivos experimentais sobre células pulpares, demonstrando o efeito não só dos componentes isoladamente, mas a interação dos monômeros frente à diferentes formulações, de forma a simular a aplicação clínica desses agentes e seus efeitos diante as células da polpa. Assim, os objetivos do presente estudo são avaliar os efeitos de diferentes concentrações de HEMA na citotoxicidade de adesivos com e sem solvente sobre células pulpares, analisando também a viabilidade celular e liberação de mediadores inflamatórios.

2 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que tanto a presença de HEMA quanto do etanol reduzem a viabilidade das células pulpares.

Também é possível concluir que a adição de solvente aos adesivos aumentou significativamente a toxicidade dos mesmos.

Ainda, conclui-se que a presença de HEMA e de etanol nos adesivos é capaz de modular a liberação de citocinas inflamatórias; todavia, nem todos os mediadores analisados são influenciados por tais variáveis.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- [1] Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent*. 2004;17:104-8.
- [2] Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Yiu C, Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent*. 2005;18:315-9.
- [3] Fabre HS, Fabre S, Cefaly DF, Carrilho MR, Garcia FC, Wang L. Water sorption and solubility of dentin bonding agents light-cured with different light sources. *J Dent*. 2006.
- [4] Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, et al. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater*. 2006.
- [5] 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;15:434-41.
- [6] Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alecio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol*. 2008.
- [7] Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*. 1991;70:1450-5.
- [8] 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;25:443-57.
- [9] Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J*. 2003;36:831-9.
- [10] 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;17:230-40.
- [11] 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;81:175-84.
- [12] Hebling J, Giro EM, Costa CA. Human pulp response after an adhesive system application in deep cavities. *J Dent*. 1999;27:557-64.
- [13] Hebling J, Giro EM, Costa CA. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod*. 1999;25:676-82.

- [14] Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*. 1995;74:1602-6.
- [15] Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007;28:3757-85.
- [16] Van Landuyt KL, Snauwaert J, Peumans M, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. The role of HEMA in one-step self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2008.
- [17] Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials*. 2005;26:745-53.
- [18] Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mater*. 2006;22:434-40.
- [19] Lee DH, Kim NR, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of TEGDMA and HEMA on the expression of COX-2 and iNOS in cultured murine macrophage cells. *Dent Mater*. 2009;25:240-6.
- [20] Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dent Mater*. 2008;24:134-40.
- [21] Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*. 1997;2:d12-26.
- [22] Wellner P, Mayer W, Hickel R, Reichl FX, Durner J. Cytokine release from human leukocytes exposed to silorane- and methacrylate-based dental materials. *Dent Mater*. 2012;28:743-8.
- [23] Nakanishi T, Takegawa D, Hirao K, Takahashi K, Yumoto H, Matsuo T. Roles of dental pulp fibroblasts in the recognition of bacterium-related factors and subsequent development of pulpitis. *Japanese Dental Science Review*. 2011;47:161-66.
- [24] Chang MC, Lin LD, Chan CP, Chang HH, Chen LI, Lin HJ, et al. The effect of BisGMA on cyclooxygenase-2 expression, PGE2 production and cytotoxicity via reactive oxygen species- and MEK/ERK-dependent and -independent pathways. *Biomaterials*. 2009;30:4070-7.
- [25] Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, et al. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 2004;25:4573-80.

[26] Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G, et al. TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials*. 2009;30:2006-14.

[27] Ginzkey C, Zinnitsch S, Steussloff G, Koehler C, Hackenberg S, Hagen R, et al. Assessment of HEMA and TEGDMA induced DNA damage by multiple genotoxicological endpoints in human lymphocytes. *Dent Mater*. 2015;31:865-76.