

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM MATERIAIS DENTÁRIOS

ÉDIO GIACOMELLI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E
GENOTOXICIDADE CELULAR DO CIMENTO DE IONÔMERO
DE VIDRO MODIFICADO POR CARBONATO DE CÁLCIO**

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Orientadora

Porto Alegre
2016

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	18
3. HIPÓTESES.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS.....	45
9. ANEXOS.....	52

RESUMO

Este estudo teve o objetivo de avaliar a biocompatibilidade do cimento de ionômero de vidro (CIV) convencional modificado por carbonato de cálcio de conchas marinhas por meio dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade celular. O carbonato de cálcio (CC), nas proporções de 1%, 5% e 10%, foi adicionado ao pó do CIV. Utilizando uma matriz de politetrafluoretileno (10 mm de diâmetro e 3 mm de altura), foram confeccionadas as amostras, sendo obtidos quatro grupos (n=4): G1 – apenas CIV (controle); G2 – CIV com 1% de CC; G3 – CIV com 5% de CC; G4 – CIV com 10% de CC. A preparação das amostras foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-12. O ensaio MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade celular, e os ensaios de micronúcleo e cometa foram realizados para avaliar a genotoxicidade, por meio da utilização de uma cultura celular de fibroblastos de camundongo da linhagem NIH/3T3. De acordo com o ensaio MTT, as amostras contendo a adição de 1% e 5% de CC apresentaram um maior potencial citotóxico, e as amostras com 10% de CC apresentaram um índice de viabilidade celular comparável ao do CIV. O ensaio do micronúcleo evidenciou que o CIV com 10% de CC produziu uma melhora no potencial proliferativo celular (IPBC). CIV com 5% de CC apresentou uma redução no IPBC que não compromete o material do ponto de vista genotóxico. No ensaio cometa, os grupos com adição de CC mostraram um pequeno aumento do potencial genotóxico em comparação ao CIV. Concluiu-se que a adição de 10% de CC ao CIV apresentou um baixo potencial citotóxico, sendo viável para utilização em ambiente celular, e a adição de 1%, 5% e 10% de CC ao CIV não induziu a um dano genético.

Palavras-chave: Citotoxicidade, genotoxicidade, cimento de ionômero de vidro, carbonato de cálcio, MTT, ensaio cometa, teste do micronúcleo, IPBC, viabilidade celular, *scaffold*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of conventional glass ionomer cement (GIC) modified by calcium carbonate by means of cytotoxicity and genotoxicity tests. The calcium carbonate (CC), in proportions of 1%, 5% and 10%, was added to the GIC powder. A polytetrafluoroethylene matrix (10 mm diameter and 3 mm height) was used to make the samples, and four groups were obtained (n = 4): G1 – only GIC (control); G2 – GIC with 1% CC; G3 – GIC with 5% CC; G4 – GIC with 10% CC. The preparation of the samples was carried out in accordance with ISO 10993-12. The MTT test was used to evaluate the cell cytotoxicity, and the micronucleus and comet tests were performed to evaluate the genotoxicity, by using a mouse fibroblast cell culture of the NIH/3T3 lineage. According to MTT test, the samples with 1% and 5% CC showed a higher cytotoxic potential, and the samples with 10% CC presented a cellular viability index comparable to the GIC. The micronucleus test showed that GIC with 10% CC produced an improvement in cell proliferative potential (IPBC). CIV with 5% CC had a reduction in IPBC that did not compromise the material from the genotoxic point of view. In the comet test, groups with the addition of CC had a small increase in genotoxic potential compared with GIC. It was concluded that the addition of 10% CC to the GIC had a low cytotoxic potential and it is feasible for use in the cellular environment, and the addition of 1%, 5% and 10% CC to the GIC did not induce genetic damage.

Key-words: Cytotoxicity, genotoxicity, glass ionomer cement, calcium carbonate, MTT, comet test, micronucleus test, IPBC, cell viability, scaffold.

1 INTRODUÇÃO

Desde que foram introduzidos na odontologia na década de 70 por Wilson e Kent, os Cimentos de Ionômero de Vidro (CIV's) vêm sendo utilizados amplamente em diversas áreas da odontologia (WILSON, KENT, 1972). Foram vistos, inicialmente, como potenciais substitutos dos cimentos de silicato que já estavam em uso por mais de 80 anos (ATKINSON, PEARSON, 1985).

Entre as propriedades dos CIV's, duas características tornaram esse material bastante aceito: a capacidade de proporcionar uma união química ao esmalte e à dentina por meio de trocas iônicas, e o benefício adicional da liberação de flúor. Assim, os CIV's combinam as qualidades adesivas dos cimentos de policarboxilato de zinco com a liberação de flúor dos cimentos de silicato (BILLINGTON, WILLIAMS, PEARSON, 1990; BERG, 2002)

Inicialmente os CIV's foram utilizados principalmente para restaurações de lesões causadas por abrasão e erosão e como agentes de cimentação. Porém, as características, como baixa solubilidade, resistência à abrasão e biocompatibilidade, fizeram com que novas formulações fossem estudadas para ampliar sua aplicação clínica (MOUNT *et al.*, 1994; NAASAN, WATSON, 1998).

Diferentes estudos avaliaram as características biocompatíveis deste material e poucos relatos de reações adversas foram registrados (LEYHAUSEN *et al.*, 1998; BROOK, HATTON, 1998). Aproveitando a resposta biológica favorável oferecida pelo CIV, algumas atenções frente às suas aplicações começaram a se voltar para utilização como um biomaterial. Em 1998, Brook e Hatton iniciaram trabalhos visando à utilização dos CIV's na medicina, apoiado nas suas propriedades. Nesses estudos

iniciais, não foram observadas clinicamente reações adversas graves. Estudos *in vitro*, avaliando a biocompatibilidade dos CIV em relação aos tecidos e às estruturas ósseas, verificaram que este material tem comportamento bioativo (GROSS, SCHMITZ, STRUNZ, 1988; WALLACE *et al.*, 1999).

Ampliando os estudos sobre o CIV, Giacomelli(2011) realizou a adição de conchas marinhas trituradas ao pó do CIV convencional. As conchas marinhas possuem uma estrutura calcárea constituída basicamente por carbonato de cálcio (CaCO_3), o que resultou na modificação estrutural com formação de porosidades e de arcabouços após a manipulação. O autor concluiu que a formação destes arcabouços presentes na estrutura podem ser considerados de suma importância, uma vez que apresentam função de receptáculo ou *scaffold* para alojar células, antibióticos ou outros materiais, proporcionando assim aumento na adesividade e proliferação celular, promovendo uma melhora na capacidade de osseointegração do material. Ainda, quando submetidas a um teste de pH, foi observado que as amostras do CIV adicionado de conchas marinhas apresentaram índices próximos ao pH neutro (pH=7), o que possibilita uma melhor adequação ao ambiente fisiológico (GIACOMELLI, 2011).

A pesquisa sobre inclusão de conchas marinhas no CIV vem ao encontro atual das pesquisas de desenvolver, investigar e aprimorar materiais com características mecânicas e biológicas compatíveis com a aplicação a que se destinam e com um desempenho satisfatório, sendo a biocompatibilidade um quesito essencial para os materiais.

Na avaliação da biocompatibilidade dos materiais, testes de citotoxicidade *in vitro* são considerados testes reproduzíveis, relevantes e adequados para a avaliação de aspectos biológicos relacionados à biocompatibilidade (CHANG, GOULD, 1998).

Neste tipo de análise, o ensaio pelo brometo (3-(4,5 dimetiltiazol- 2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) demonstrou ser rápido e preciso. Este reflete não somente o número de células de uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, porque é baseado na atividade de enzimas, como a succinildesidrogenase, presente em células viáveis (BOUILLAGUET *et al.*, 2004).

Apesar de existirem muitos estudos na literatura referentes à citotoxicidade dos biomateriais, verifica-se que ainda existem poucos trabalhos que avaliam possíveis danos que estes materiais podem causar ao DNA celular, sendo este um fator importante de influência na biocompatibilidade, uma vez que prejuízos ao genoma celular podem diminuir significativamente o potencial de auto-reparação tecidual, ou causar o desenvolvimento de neoplasias em longo prazo (ASKARI *et al.*, 2003).

Os testes de genotoxicidade são testes *in vitro* designados para detectar produtos e componentes que induzam danos ao material genético das células, tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA, sendo um importante indicador carcinogênico (SHINN, TING-YI, 2010).

Dentre os testes de genotoxicidade *in vitro* destaca-se o teste de micronúcleo (MN) (ANDRIGHETTI-FROHNER *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2006), utilizado para detecção de mutações cromossômicas, como clastogenes e aneugenes, porque os fragmentos de cromossomos e cromossomos atrasados conduzem à formação de micronúcleos na interfase do ciclo celular. O dano da membrana celular, inibição de atividades enzimáticas, ou protéicas, síntese de RNA e DNA, ou a simples estimativa do número de células sobreviventes após o tratamento com materiais dentários são alguns indicadores utilizados para análise de modificações na função celular (SCHWEIKL, LANGER, SCHMALZ, 2004). Outro teste que avalia a genotoxicidade é o ensaio

cometa. Nas últimas décadas, este teste passou a ser muito utilizado, sendo que o princípio desta técnica é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN *et al.*, 2003).

Portanto, para a avaliação de um novo material, tanto os testes de citotoxicidade como de genotoxicidade são importantes para avaliação da biocompatibilidade.

7 CONCLUSÕES

As metodologias empregadas no estudo permitiram concluir que:

- A adição de 10% de carbonato de cálcio de conchas marinhas ao CIV apresenta um baixo potencial citotóxico, sendo viável para utilização em ambiente celular.
- A adição de 1%, 5% e 10% de carbonato de cálcio de conchas marinhas ao CIV não induziram a um dano genético nas células testadas.