

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

**Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial
inibitório da MMP-2 por monômeros metacrilatos
aplicáveis na odontologia restauradora adesiva**

Eliana do Nascimento Torre

Pelotas, 2011

ELIANA DO NASCIMENTO TORRE

**Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial inibitório da
MMP-2 por monômeros metacrilatos aplicáveis na
odontologia restauradora adesiva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Dentística.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Etges

Co-orientadores: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite
Prof. Dr. Rodrigo Varella de Carvalho

Pelotas, 2011

Dados de Catalogação da Publicação

T689c

Torre, Eliana do Nascimento

Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial inibitório da MMP-2 por monômeros metacrilatos aplicáveis na odontologia restauradora adesiva / Eliana do Nascimento Torre ; orientador: Adriana Etges ; co-orientador: Rodrigo Varella de Carvalho, Fábio Renato Manzolli Leite. – Pelotas: UFPel, 2011.
96f. ; fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado) Dentística. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

1. Metaloproteinase. 2. Monômero. 3. Citotoxicidade.
4. Genotoxicidade. 5. Zimografia.

I. Etges, Adriana (orient.). II. Carvalho, Rodrigo Varella de (co-Orient.) III. Leite, Fábio Renato Manzolli (co-orient.)

D2

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Etges

Profa. Dra. Andréa da Silva Ramos Rocha

Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Profa. Dra. Cristiane Furuse (Suplente)

Notas preliminares

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de descrição 1. Estrutura tradicional, que consta no Apêndice A do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (http://www.ufpel.edu.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Paulo e Neiva**... Agradeço a Deus por tê-los como pais! Muito obrigada por sempre acreditarem em mim, e por serem estas pessoas maravilhosas, com este amor incondicional. Dedico à vocês esta vitória alcançada!

Amo vocês!

Álbio! Agradeço muito, muito, muito por toda a paciência e incentivo constantes! Tendo sempre a palavra certa, na hora certa! Agradeço por ser meu amigo, companheiro e grande amor! Dedico à você também este trabalho. Te amo tanto!!

À minha irmã... **Rosana**, e cunhadinho **Eliézer**... muito obrigada pelo apoio, e torcida, mesmo de longe!! Amo muito vocês!!

Agradecimentos

À **Deus** pela minha vida, por iluminar meu caminho e nele colocar sempre pessoas muito especiais e do bem...

À minha **família** e **amigos** por todo o incentivo e carinho...

À prof. Dra. **Adriana Etges**, a qual é difícil chamar de professora, devido à grande amizade que existe entre nós... Agradecer é pouco... você é responsável por hoje eu estar completando mais esta etapa de minha vida... Agradeço pela confiança, mesmo quando nem eu mesma tinha idéia do quão difícil seria entender um pouquinho da biologia molecular (e tomei gosto!)... Agradeço pelo carinho e porto-seguro que você transmite! Muito obrigada de verdade!

Ao prof. Dr. **Fábio Leite**... minha imensa gratidão por tudo o que você é... Por ter me acolhido com carinho e amizade... por ter compartilhado comigo seu imenso conhecimento... E mesmo em tão pouco tempo de convivência ter despertado em mim, uma grande admiração!

Ao prof. Dr. **Rodrigo Carvalho**, obrigada mesmo, por ter me iniciado nesta vida da biologia molecular!

Ao prof. Dr. **Flávio Demarco**, coordenador do Curso de Pós Graduação desta escola, o meu muito obrigado, por ser sempre esse exemplo a ser seguido, pessoal e profissional... Agradeço também por acreditar que de uma protesista poderia sair uma pesquisadora (risos)... Agradeço mesmo sua confiança e o admiro muito!

Ao meu amigo de sempre, prof. Dr. **Josué**! Amigo... agradeço por to incentivo, desde que voltei à esta escola, até hoje. Minha enorme admiração ~~para~~ pessoa e pelo profissional que você é! Muito obrigada por tudo que aprendi e que tenho certeza, continuarei aprendendo!

Agradeço o carinho, humor e sabedoria dos profs. Drs. **Luis Eduardo, Luis Fernando, Rudimar, Lund e Oscar** na convivência nas disciplinas ECO e da UCO III.

Às profs. Dras. **Sandra** e **Ana Paula** por dividirem e me acolherem neste laboratório, agradeço suas sempre carinhosas palavras de incentivo! E à mais nova prof. **Cristiane**, obrigada também pela amizade!

À prof. Dra. **Adriana Silva**, pela doação do Padrão de Peso Molecular.

À todos os **professores** da Pós-Graduação, agradeço os ensinamentos e a partilha de grandes experiências e incentivos!

Às grandes amigas, **Fabi e Francine**...você foram as responsáveis por eu estar aqui hoje e quero agradecer e dividir com vocês esta conquista! Amo muito vocês!!

Às colegas de laboratório **Fernanda N.** que sempre me brindou com seus conselhos inteligentes, pertinentes e na hora certa !!

Obrigada **Alê**, pela convivência, e pela grande ajuda com o início da zimografia.

À **Sônia**, amiga, não tenho palavras para agradecer a convivência que tivemos... obrigada pelo companheirismo em momentos, nem sempre tão fáceis...

Marília B., você está fazendo falta... com quem farei zimografias?? (risos)

À **Laura**, a colega que virou amiga.... obrigada por dividir as alegrias e também as angústias da rotina de um laboratório.... quando o cultivo primário não dava certo, quando o gel não marcava, quando a geno não corava... mas tenho certeza que vamos nos orgulhar dos nossos progressos e acertos!!! Obrigada de verdade, amiga !!

Ao **Maicon**... meu imenso agradecimento pela sua companhia, sua boa von e toda a sua ajuda neste trabalho! Muito obrigada também pela sua amizade... Vou dedica à tudo o que se propõem! Deixo aqui também meu agradecimento à **Tais, Wellington e Camila**, aprendi muito com vocês !

Ao pessoal dos laboratórios... muitíssimo obrigada por toda a ajuda prestada.... **Taiane, Ivana, Ilda, Fausto, Silvana, Tati (CDC-BIO), Cíntia**...

Aos alunos da Engenharia de Materiais, **Tiago e Mateus** e à técnica da Biotecnologia, **Caroline**, muito obrigada pelas suas contribuições à este trabalho!!

À colega **Deise**, obrigada suas palavras, sempre de incentivo, deu certo... as células cresceram e multiplicaram-se....

À prof. Dra. **Juliana Santos**, por ter sido tão receptiva e prontamente ter me ajudado com o protocolo de extração de MMPs.

Aos meus queridos colegas bucomaxilo-faciais **Fábio, Maurício, Fabrício, André**, e aos colegas da cirurgia desta escola! Sem os terceiros molares doados, este trabalho não teria sido concluído !! Muito obrigada de verdade !

Ao aluno **Alexandre**, por doar seus terceiros molares com muito carinho, meu sincero agradecimento !

Aos queridos colegas da pós-graduação **Adauê, Alê, Aline, Ayah, Bianca, Carol, Caroline, Deise, Eduarda, Eliseu, Fabiana, Fernanda N, Fernanda V, Francine, Françoise, Genara, Gregory, Hugo, José Ricardo, Laura, Lísia, Luciana,**

Marcos B, Marcos P, Marcus, Marina, Marília B, Marília G, Mauro, Raquel, Renato, Sílvia, Simone, Sônia, Vanessa... Obrigada a cada um pela amizade!

À secretária da PPGO, **Josiane** Silva, obrigada pela agradável convivência e amizade.

Ao **Programa de Pós Graduação** em Odontologia/UFPel, representado pelo Coordenador Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco, agradeço a oportunidade única!

À **Faculdade de Odontologia**, minha escola, na pessoa da prof. Dra. Márcia Bueno, Diretora, o meu orgulho por estar novamente aqui, e o meu reconhecimento!

Ao **CNPq** pela concessão da Bolsa de Mestrado, que foi incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

“Algo só é impossível até
que alguém duvide e
acabe provando o
contrário”.

Albert Einstein

Resumo

TORRE, Eliana do Nascimento. **Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial inibitório da MMP-2 por monômeros metacrilatos aplicáveis na odontologia restauradora adesiva.** 2011. 96f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Restaurações adesivas apresentam desempenho satisfatório em avaliações de curto prazo, porém quando o período de avaliação da longevidade dessas restaurações é maior, problemas com a estabilidade do polímero formado pelo sistema adesivo e com a degradação do colágeno formador da camada híbrida, provocam uma queda expressiva na durabilidade desse tipo de restauração. As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são enzimas que têm sido associadas com a degradação do colágeno formador da camada híbrida e, por isso, a possibilidade de inibir a atividade dessas enzimas tem sido considerada uma estratégia importante para a manutenção e aumento da longevidade das restaurações adesivas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial inibitório da MMP-2 por monômeros com características promissoras relatadas na literatura relacionadas ao seu potencial inibidor de MMPs, sendo estes, EGDMA (1), TEGDMA (2), T4GDMA (3), PEG200 DMA (4) e PEG400 DMA (5). Dentina humana derivada de dentes recentemente extraídos foi utilizada para a obtenção e purificação das MMPs. O ensaio de inibição da MMP-2 foi realizado por zimografia. Testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados com uma linhagem primária de fibroblastos pulpares humanos (FPH), além de uma linhagem imortalizada de fibroblastos de camundongos 3T3/NIH. O teste colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) foi usado para medir a citotoxicidade dos produtos testados, enquanto que o teste de formação de micronúcleos foi usado para avaliar a genotoxicidade. Em todos os grupos a concentração de 10mM induziu a 100% de morte celular. Não houve diferença de sensibilidade nas duas linhagens estudadas. Estatisticamente, em relação ao grupo controle/não tratado, os monômeros foram mais citotóxicos nos FPHs nos grupos 4 e 5. Resultados semelhantes foram encontrados na linhagem 3T3, à exceção do grupo 2, que apresentou diferença estatística em todas as suas concentrações, nesta célula. Houve maior número de células micronucleadas nos grupos onde foram utilizados os dois monômeros de cadeias intermediárias mais longas (PEG200 DMA e PEG400 DMA) quando comparados ao controle, sugerindo os resultados, que estes monômeros são mais citotóxicos e genotóxicos. A maioria dos monômeros metacrilatos apresentou considerável, mas não total inibição da MMP-2 em todas as concentrações através dos ensaios de zimografia. A exceção foi o PEG200DMA, o qual somente a concentração de 5mM inibiu a atividade gelatinolítica da referida MMP.

Palavras-chave: MMP-2. Monômeros. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Zimografia.

Abstract

TORRE, Eliana do Nascimento. **Cytotoxicity, genotoxicity and MMP-2 inhibitory potential of methacrylate monomers applied in adhesive restorative dentistry.** 2011. 96f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Adhesive fillings are satisfactory on short-term evaluation. However, when the evaluation period of longevity of these fillings is longer, problems with the stability of the polymer formed by the adhesive system and the degradation of collagen forming the hybrid layer provoke a large decrease in the durability of this type of filling. The extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes, which have been associated with the degradation of collagen present at the hybrid layer. Therefore, the possibility of inhibiting the activity of these enzymes has been considered an important strategy to maintain and increase the longevity of adhesive fillings. Hence, the aim of this work is to evaluate the inhibitory potential of MMPs through the addition of the monomers with promising characteristics reported in previous studies. These monomers have molecules known as “kidnappers” of bivalent cations. This characteristic is important because the catalytic place of MMPs has zinc and calcium in its constitution. Therefore, the coordination of molecules with the catalytic place of the enzyme would be able to inhibit the activity of the MMPs. Dentine from teeth recently pulled will be used to obtain and purify the MMPs of dentine.. The analysis of MMPs inhibition will be carried out through a zymography. In case of positive results for the inhibition of MMPs, cytotoxicity and genotoxicity tests will be carried out in cellular lineages of human pulp fibroblasts apart from an immortalized lineage of fibroblasts of 3T3/NIH mice. The MTT (bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-ilo)-2,5-diphenyltetrazolium) colorimetric test will be used to measure the cytotoxicity of the products tested and the test of micronucleus will be used to measure genotoxicity. In all groups the 10mM concentration induced 100% cell death. There was no difference in sensitivity in both strains. Statistically, in relation to the control group/untreated, the monomers were more cytotoxic in HPFs of groups 4 and 5. Similar results were found for the 3T3 lineage, except for group 2, which also showed statistical significance for all concentrations. There was a higher number of micronucleated cells in the groups where the two monomers of intermediate chains longer (PEG200 and PEG400 DMA) were used when compared to control. The results suggest that these two monomers are more cytotoxic and genotoxic. Most of the methacrylate monomers showed considerable but not total inhibition of MMP-2 by zymography. The exception was the PEG200 DMA, which only the concentration of 5 mM inhibited the activity of this gelatinolytic MMP.

Keywords: MMP-2. Monomer. Cytotoxicity. Genotoxicity. Zymography.

Lista de figuras

Figura 1	Esquema da estrutura geral básica das MMPs.....	29
Figura 2	Estrutura molecular dos monômeros dimetacrilatos, onde n é o número de cadeias de óxido de etileno existentes em cada um dos monômeros testados. Nas extremidades os 2 grupamentos metacrilatos. Quanto maior o n, maior o peso molecular da substância.....	35
Figura 3	Terceiro molar armazenado em meio de cultivo à 4°C (a); coroa dentária com esmalte já removido (b); dentina coronária em fatias de 0,8 mm (c); moagem manual das fatias dentinárias (d).....	45
Figura 4	Fibroblastos imortalizados (3T3/NIH), em confluência 40% (a) e em confluência 70% (b), forma estrelada (aumento de 40X (a) e 10X (b)).....	54
Figura 5	Explants (setas brancas) e o início da migração dos fibroblastos pulpares humanos (setas pretas) (a, b, c) e FPHs em baixa confluência (d, e) e em confluência 70%(f), forma bem alongada (aumento de 40X).....	57
Figura 6	Fotomicrografia de célula micronucleada, MN (seta) de forma arredondada (a); um dos critérios de exclusão: cromatina condensada em duas células-filhas, pós-mitose (b).....	63
Figura 7	Controle mostrando que não houve inibição quando incubados apenas em Tris-CaCl ₂ (b); caracterização das enzimas como MMPs pois suas expressões foram inibidas por EDTA (c) e NEM (a) não teve nenhum efeito sobre a atividade da MMP. Gel de zimografia revelando a atividade da MMP-2(66KDa).....	65
Figura 8	Padrão de peso molecular (b) (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen), bandas correspondentes à pesos moleculares expressos em KDa, a partir de 20KDa. Banda em 66KDa, correspondendo à forma ativa da MMP-2 (a).....	65
Figura 9	Géis de zimografia – as imagens mostram a inibição da expressão da MMP-2 pelos monômeros metacrilatos condicionados em tampão Tris-CaCl ₂	66

Lista de tabelas e gráficos

Tabela 1	Comparação de propriedades físico/químicas dos monômeros metacrilatos usados neste estudo.....	35
Tabela 2	Peso, fórmula e estrutura molecular dos diferentes monômeros....	51
Tabela 3	Descrição numérica do percentual de inibição de cada concentração dos monômeros metacrilatos. O número 0 (zero) dos controles indica todo o potencial enzimático da MMP-2, e os demais algarismos representam a inibição da enzima em relação ao seu respectivo controle.....	67
Tabela 4	Frequência de células MN após 24 horas de exposição aos monômeros (n=2000). Diferentes letras indicam diferença estatística entre os resultados ($p < 0.05$).....	71
Quadro 1	Descrição dos reagentes dos géis de poliacrilamida.....	49
Quadro 2	Reagentes e respectivas quantidades para o uso na zimografia....	52
Gráfico 1	Sobrevivência celular de FPH (a) e 3T3 (b) expostos por 24 hs à EGDMA (1),TEGDMA (2), T4GDMA (3), PEG 200 DMA (4) e PEG 400 DMA (5) nas diferentes concentrações. Dados normalizados de acordo com a densidade das leituras (absorbância de 570nm) de quatro culturas de cada tipo celular, feitas em triplicatas. As barras representam as medianas, e asterisco representa diferença estatística com relação ao controle (não tratados).....	69
Gráfico 2	Comparação da quantidade de células 3T3/NIH micronucleadas do grupo controle (não tratado) com a quantidade de células MN após a exposição de 24h de cada monômero (0,1mM).....	70

Lista de abreviaturas e siglas

%	percentual
μm	micrometro
μl	microlitro
<	menor
>	maior
$^{\circ}\text{C}$	graus celsius
ANOVA	análise de variância
BIS-GMA	bisfenol a glicidil metacrilato
BSA	Bovine serum albumin (albumina sérica bovina)
Ca^{++}	Cálcio
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
CHX	gluconato de clorexidina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio Essencial de Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
Dp	Desvio padrão

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
et al	e colaboradores
FO	Faculdade de Odontologia
FPH	Fibroblastos pulpaes humanos
GSH	Glutathione
H	Hora
HEMA	2-hidroxietil dimetacrilato
KDa	quilodalton (unidade de medida de massa)
M	Molaridade
MB	Membrana basal
MEC	Matriz extra celular
mg	Miligrama
Min	Minuto
mm	Milímetro

mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase da matriz
MN	Micronúcleo
MTT	Sal tetrazolium[3-(4,5-dimetiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo]
N	Normalidade
NEM	n-etil-maleimida
PBS	phosphate buffer saline (tampão fosfato salino)
PEG	Polietilenoglicol
PEG200DMA	Polietilenoglicol dimetacrilato 200
PEG400DMA	Polietilenoglicol dimetacrilato 400
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Inibidor de Proteases
Primer	Agente adesivo hidrofílico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Segundo

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
T4GDMA	Tetraetilenoglicol dimetacrilato
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
TIMPs	Inibidores teciduais de MMPs
TM-MMP	Metaloproteinase tipo-membrana
Tris-HCl	Tri-Hidroximetilamino metano cloridrato
UDMA	Uretano Dimetacrilato
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
V	Volume
Zn ⁺⁺	Zinco

Sumário

1 Introdução	19
2 Objetivos	21
3 Revisão de literatura	22
3.1 Degradação enzimática da Camada Híbrida	22
3.2 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)	24
3.2.1 Classificação das MMPs	25
3.2.2 Estruturas das MMPs	26
3.2.3 Dentina X MMP-2	27
3.2.4 Inibidores exógenos das MMPs	29
3.3 Monômeros metacrilatos	32
3.3.1 Características físico-químicas dos monômeros metacrilatos	35
3.3.2 Biocompatibilidade dos monômeros metacrilatos	36
4 Materiais e métodos	42
4.1 Técnica de extração da MMP-2 da dentina	42
4.2 Quantificação proteica	45
4.3 Zimografia	47
4.3.1 Preparo do gel de separação e gel de largada	47
4.3.2 Corrida e incubação dos géis	47
4.3.3 Controle	49
4.3.4 Padrão de peso molecular	50
4.3.5 Identificação da MMP por inibição química específica	50
4.3.6 Inibição MMPs pelos monômeros-teste	50
4.3.7 Monômeros metacrilatos usados neste estudo	51
4.3.8 Coloração e descoloração dos géis	53
4.3.9 Digitalização das imagens	53

4.4 Cultivo celular	53
4.4.1 Cultivo da linhagem 3T3/NIH	54
4.4.2 Técnica do cultivo primário - FPHs	55
4.4.3 Subcultivo	56
4.4.4 Contagem Celular	57
4.5 Ensaio de viabilidade celular	59
4.6 Ensaio de Genotoxicidade	61
5 Resultados	64
6 Discussão	72
7 Conclusões	85
8 Referências	86
Anexo A	95
Anexo B	96

1 Introdução

Apesar do desempenho satisfatório da maioria dos adesivos dentinários em estudos de curto prazo de avaliação, esses materiais deterioram drasticamente quando avaliados em estudos de longevidade (DE MUNCK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008). Essa característica tem sido atribuída ao envelhecimento e consequente degradação da camada híbrida, sendo esta última a principal responsável pela queda da resistência adesiva entre o dente e a restauração (DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008), resultando na perda da mesma. A degradação hidrolítica do polímero resinoso constituinte da camada híbrida é considerada um fator primordial para a queda da resistência adesiva entre o dente e a restauração (DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008). Entretanto, atualmente estudos associam a esse fator a degradação enzimática do colágeno dentinário (PASHLEY et al., 2004; HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b). Um crescente número de estudos tem avaliado o efeito de enzimas proteolíticas na degradação do colágeno presente nesta camada (NISHITANI et al., 2006; TAY et al., 2006; CARRILHO et al., 2007b). Muitos destes estudos têm atribuído um papel importante a um grupo de enzimas chamado de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) no processo de degradação (PASHLEY et al., 2004; NISHITANI et al., 2006; TAY et al., 2006). Dentre as MMPs, a metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2), também conhecida como gelatinase A, está presente em grande quantidade na dentina humana (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000).

Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são enzimas proteolíticas chamadas de endopeptidases, as quais são dependentes de zinco por possuírem cátions de zinco em seu domínio catalítico. Estas enzimas participam da remodelação da matriz extracelular através da degradação de macromoléculas, tais como os diferentes tipos de colágenos e componentes da membrana basal. Estão envolvidas numa série de processos patológicos e fisiológicos, como desenvolvimento embrionário, remodelamento do tecido conjuntivo, crescimento e reparo tecidual e também desenvolvimento de neoplasias. Fisiologicamente as MMPs estão sempre em equilíbrio

com seus inibidores teciduais, os TIMPs (WOESSNER, 1999; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; ZHANG et al., 2009).

Odontoblastos humanos têm a capacidade de sintetizar a gelatinase A (MMP-2) durante a formação dentinária (TJADERHANE et al., 1998), fazendo com que a MMP-2 esteja presente em grande quantidade na dentina humana (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007). O estudo da formação e longevidade da camada híbrida, tem sido influenciado positivamente por produtos com potencial de inibição de MMPs, a exemplo do Gluconato de Clorexidina (CHX) (HEBLING et al., 2005; PASHLEY et al., 2004; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; BRESCHI et al., 2010b; MOON et al., 2010). Recentemente foi demonstrado que monômeros usados amplamente na odontologia restauradora adesiva como o HEMA (CARVALHO et al., 2009), o TEGDMA (CARVALHO et al., 2010) e um novo monômero, o Metacrilato de Zinco (HENN et al., 2011) foram capazes de inibir as MMPs endógenas.

O monômero Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA) e outros com os mesmos grupamentos metacrilatos (EGDMA, T4GDMA, PEG200DMA e PEG400DMA), mas com diferentes pesos moleculares e comprimentos de cadeias, foram investigados neste estudo. Os monômeros testados possuem grupamentos éter (oxigênio ligado diretamente a dois grupos orgânicos) e cadeias bem longas e flexíveis com capacidade de formar éteres de coroa (flexão que a molécula do monômero é capaz de fazer quando forma um complexo com o oxigênio do grupamento éter ou do grupamento carbonila e o cátion bivalente presente no sítio catalítico da MMP) (CARVALHO et al, 2009; CARVALHO et al, 2010). Tendo em vista que o sítio catalítico das MMPs possui cálcio e zinco em sua constituição, espera-se que essas substâncias sejam efetivas na inibição de MMPs. A possibilidade de utilizar essas moléculas como inibidores de MMPs associadas a materiais restauradores adesivos requer também a investigação das suas propriedades biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar novos monômeros metacrilatos quanto ao seu potencial inibitório de MMP-2, derivada de dentina humana e sua biocompatibilidade.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial inibitório da atividade gelatinolítica e colagenolítica de monômeros metacrilatos, assim como a sua biocompatibilidade.

2.2 Objetivos específicos

Analisar se o tamanho da cadeia (quantidade de radicais) tem influência no poder de inibição da atividade gelatinolítica e colagenolítica dos monômeros metacrilatos testados.

Comparar o grau de citotoxicidade produzido pelos diferentes monômeros testados, quanto ao tipo e tamanho do monômero metacrilato.

Verificar a genotoxicidade dos monômeros metacrilatos testados, comparando-os quanto ao tipo e tamanho dos monômeros.

2.3 Hipótese

A hipótese nula é (1) que as substâncias avaliadas não tenham nenhum potencial inibitório sobre a atividade da MMP-2 da dentina humana e (2) a biocompatibilidade destes monômeros metacrilatos seja diferente à dos materiais usados na composição de adesivos dentinários, na atualidade.

3 Revisão de literatura

3.1 Degradação enzimática da camada híbrida (CH)

Desde que a adesão foi estabelecida pela impregnação do substrato dentinário por uma mistura de monômeros resinosos, a estabilidade da interface de união depende da formação de uma compacta e homogênea camada híbrida (NAKABAYASHI et al., 1982).

A maioria dos sistemas adesivos tem um bom desempenho a curto prazo, porém estes materiais degradam drasticamente a longo prazo (DE MUNCK et al., 2003; BRESCHI et al., 2008).

Dentre os diferentes fenômenos de envelhecimento que ocorrem na interface de união resina-dentina, alguns são considerados fundamentais na degradação da camada híbrida como a insuficiente impregnação da dentina durante o processo adesivo, a alta permeabilidade da interface de união, a sub-polimerização dos monômeros e a ativação da atividade colagenolítica de enzimas endógenas do próprio hospedeiro, estes são alguns dos fatores que podem levar à redução da longevidade desta interface (PASHLEY et al., 2011).

Sendo a camada híbrida formada pela interação entre matriz orgânica dentinária, cristais residuais de hidroxiapatita, monômeros e solventes, o envelhecimento pode afetar cada um dos componentes individualmente (BRESCHI et al., 2008; DE MUNCK et al., 2003; DE MUNCK et al., 2010).

Hashimoto et al. (2003) descreveram dois padrões de degradação que ocorrem na camada híbrida (CH) após envelhecimento de um adesivo convencional de três passos. Estes autores relatam que ocorrer a desorganização das fibrilas colágenas e a

hidrólise da resina adesiva dos espaços interfibrilares da CH, enfraquecendo a resistência da adesão resina-dentina.

A hidrólise é um processo químico, no qual ocorre a quebra das ligações covalentes adesivas entre os polímeros. Este fenômeno acontece por adição de água aos ésteres dos adesivos metacrilatos, o que resulta em perda da massa resinosa. Este fato é considerado a principal razão para a degradação intrínseca da camada híbrida, contribuindo para a redução da resistência de união, tanto quanto para a degradação do colágeno (TAY et al., 2006; DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008; PASHLEY et al., 2011).

Pashley et al. (2004) mostraram uma atividade intrínseca collagenolítica em dentina mineralizada humana que pode ser inibida por inibidores específicos de proteases.. Este estudo pioneiro sobre o papel das enzimas do hospedeiro, pela primeira vez apoiou a hipótese de que a degradação do colágeno da dentina humana ocorre ao longo do tempo, não só devido à atividade de collagenases bacterianas, mas também através de enzimas endógenas, as quais são liberadas da matriz e ativadas ao longo do tempo.

As evidências de atividades collagenolítica/gelatinolítica em matrizes de colágeno parcialmente desmineralizadas são provas indiretas da existência de metaloproteinases de matriz (MMP) em dentina humana, a qual contém MMP-2 (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; BOUSHELL et al., 2008), MMP-8 (SULKALA et al., 2007), MMP-9 (DE MUNCK et al., 2010; MAZZONI et al., 2007, 2009) e MMP-3 (BOUKPESSI et al., 2008).

A suscetibilidade dos adesivos dentinários contemporâneos aos fluidos bucais e a degradação hidrolítica têm sido consequentemente associados *in vitro* e *in vivo* à degradação da união dentina-adesivo (DE MUNCK et al., 2003; HASHIMOTO et al., 2003). Associado a estes fatores, enzimas intrínsecas derivadas do hospedeiro também desempenham importante papel na degradação das camadas híbridas (HASHIMOTO et al., 2003; PASHLEY et al., 2004; TAY et al., 2006; MOON et al., 2010).

3.2 Metaloproteinases da matriz (MMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) formam um grupo de enzimas que tem identidade estrutural, mas que são geneticamente distintas, as quais constituem uma classe de endopeptidases e são principalmente envolvidas na degradação da matriz extracelular em condições patológicas e também fisiológicas (VISSE e NAGASE, 2003; STERNLICHT e WEBER, 2001). São principalmente sintetizadas na forma latente de zimogênios inativos (pró-MMPs) e requerem a ligação de um íon zinco ao seu sítio catalítico e a clivagem de um domínio pró-peptídeo para tornar-se cataliticamente competente. Muitas MMPs são ativadas fora da célula por outras MMPs ativadas ou proteinases serinas (EGEBLAD e WEBER, 2002). Esta família de enzimas é chamada MMPs pelo fato de depender de íons metálicos para sua atividade catalítica, além de possuírem habilidade de degradar proteínas estruturais da matriz extracelular (MEC). Esta habilidade é essencial para as células poderem interagir corretamente com o ambiente onde estão localizadas, e para os organismos multicelulares se desenvolverem e desempenharem sua função (STERNLICHT e WEBER 2001).

As enzimas proteolíticas são classificadas como exopeptidases ou endopeptidases baseado na clivagem do peptídeo terminal ou interno, respectivamente. Tomando como base o seu mecanismo catalítico e sensibilidade inibitória, muitas endopeptidases são classificadas como serinas, cisteínas ou MMPs. (STERNLICHT e WEBER, 2001).

Muitas destas MMPs também estão envolvidas no desprendimento e liberação dos fatores de crescimento, citocinas e receptores celulares de superfície, na ativação das pró-MMPs, na inativação das proteinases e inibidores angiogênicos (STERNLICHT e WEBER, 2001).

As MMPs regulam o comportamento celular de muitas maneiras e, por este motivo, devido à habilidade de alterar o destino celular, há necessidade de altos níveis de controle. As MMPs podem ser controladas por ativadores e inibidores endógenos,

também chamados inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), e por fatores que influenciam sua secreção, sua localização na superfície celular e sua própria degradação e liberação. Os TIMPs desempenham um importante papel por suas expressões serem reguladas de acordo com o desenvolvimento e remodelação do tecido. Em condições patológicas e de desequilíbrio de MMPs, alterações nos níveis de TIMPs são importantes, pois eles afetam diretamente o nível de atividade das MMPs (STERNLICHT e WEBER, 2001).

Como a regulação do potencial de degradação das MMPs é realizado principalmente pelos TIMPs, a quebra do equilíbrio entre TIMPs e MMPs pode resultar em patologias tais como reumatismos, osteoartrites, cardiopatias, fibroses, enfisemas pulmonares, crescimentos tumorais, invasão celular e metástases. Deste modo, MMPs são alvos atrativos para uma terapia de inibição (BODE e MASKOS, 2003).

Os TIMPs são os principais inibidores endógenos de MMPs. O balanço entre TIMPs e MMPs é muito importante para a remodelação da MEC, que é destruída em muitas doenças. O aumento da concentração de TIMPs e aplicação de inibidores extrínsecos de MMPs podem ser usados para recuperar o balanço e deste modo, bloquear da progressão da doença (ZHANG e KERN, 2009).

3.2.1 Classificação das MMPs

As MMPs degradam vários substratos, portanto podem ser divididas em subgrupos de acordo com sua especificidade para os componentes da MEC. Entretanto, como a lista de substratos de MMPs tem crescido, foi adaptado um sistema de sequência numérica para as MMPs e estas, agrupadas de acordo com a sua estrutura (EGEBLAD e WERB, 2001).

Baseado na especificidade do substrato, similaridade de sequência e organização de domínio, as MMPs dos vertebrados podem ser divididas em seis

grupos. Entre eles as collagenases, as gelatinases, as estromelisinases, as matrilisinas, as tipo-membrana e outras MMPs (VISSE e NAGASSE, 2003).

As collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) têm como função clivar o colágeno intersticial tipo I, II, III e outras moléculas da matriz extracelular. Já as gelatinases ou collagenases tipo IV (MMP-2 e MMP-9), são capazes de degradar o colágeno desnaturado, como a gelatina. As estromelisinases (MMP-3 e MMP-10) possuem especificidade pelo mesmo substrato, porém a MMP-3 tem uma maior ação proteolítica que a MMP-10. Elas degradam componentes da MEC, entretanto a MMP-3 também ativa algumas pró-MMPs. As matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) degradam também componentes da MEC, e são caracterizadas por apresentarem um domínio de hemopexina. Existem seis MMPs tipo-membrana (TM-MMP) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) Outras sete não são classificadas entre as anteriormente citadas (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23 e MMP-28), e possuem funções distintas (VISSE e NAGASE, 2003).

3.2.2 Estrutura das MMPs

Todas as MMPs possuem de três a cinco domínios. O pró-domínio, o qual mantém a enzima inativa como zimogênio até ser clivado por proteólise, o domínio catalítico (contendo zinco no seu sítio ativo), o domínio Hemopexina/Vitronectina (o qual media a interação entre enzimas e TIMPS e a associação aos receptores celulares) e o domínio rico em cisteína. As metaloproteinases tipo-membrana possuem o domínio transmembrana e as gelatinases apresentam o domínio da fibronectina, o qual é requerido para a ligação e lise do colágeno (Fig. 1) (HANNAS et al ., 2007).

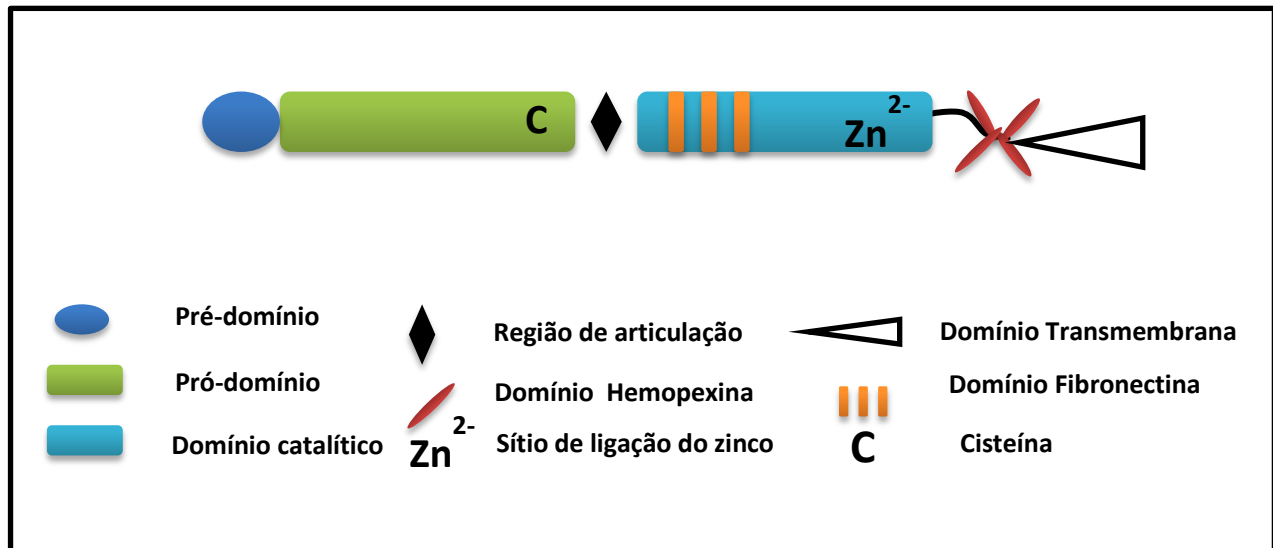


Figura 1 – Esquema da estrutura geral básica das MMPs

Fonte – Adaptado de Hannas et al., 2007.

3.2.3 Dentina X MMP-2

A dentina é um compósito biológico resistente e duro, similar a outros tecidos calcificados como o osso ou o cimento. Este tecido é constituído em média por 30% do volume por matriz orgânica, a que composta por 90% de colágeno e 10% de proteínas não colagenosas e cristais de apatita inorgânicos embebidos em uma matriz extracelular (MEC). O colágeno tipo I é o mais abundante componente orgânico da MEC, e dá à dentina resistência estrutural e propriedades biológicas, enquanto as proteínas não colagenosas, tais como as glicoproteínas, proteoglicanas e fosfoproteínas, completam esta porção orgânica, desempenhando um papel importante na dentinogênese (LINDE e GOLDBERG, 1993).

Durante a dentinogênese, estas proteínas são sintetizadas e secretadas pelos odontoblastos, e após a sua organização estrutural na camada da pré-dentina, a mineralização ocorre por deposição de cristais de hidroxiapatita. A dentinogênese e a

mineralização são fenômenos complexos que requerem o controle de atividade enzimática extracelular. Muitas proteinases, pertencentes principalmente às MMPs, têm papel crucial nestes processos (TJÄDERHANE et al., 2001).

Dentre os diferentes papéis atribuídos às MMPs no ambiente oral, estão vários eventos durante a odontogênese, bem como no desenvolvimento de processos patológicos, tais como as doenças periodontais (INGMAN et al., 1993), as cáries (TJÄDERHANE et al., 1998) e as doenças pulpares inflamatórias (GUSMAN et al., 2002).

Foram identificadas até o momento, pelo menos quatro MMPs na matriz dentinária: a estromelina I ou MMP-3 (BOUKPESSI et al., 2008), a collagenase-2 ou MMP-8 (SULKALA et al., 2007) e a gelatinase A (MMP-2) (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000) e a gelatinase B (MMP-9) (MAZZONI et al., 2007; MAZZONI et al., 2009).

Estas proteases derivadas do hospedeiro desempenham papel importante em numerosos processos fisiológicos e patológicos que ocorrem na dentina, incluindo a degradação das fibrilas colágenas, as quais são expostas por pobre infiltração dos sistemas adesivos, após o condicionamento dentinário (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007b; BRESCHI et al., 2010b; PASHLEY et al., 2011).

As gelatinases MMP-2 (72KDa) e MMP-9 (92KDa) são enzimas que degradam gelatina, ou o colágeno já desnaturado por collagenases intersticiais. Estas enzimas têm três repetições do domínio de fibronectina tipo II no seu domínio catalítico, as quais se ligam à moléculas de colágeno, gelatina e laminina. Elas também digerem moléculas da MEC incluindo colágeno tipo IV, V, XI (NAGASE, VISSE e MURPHY, 2006).

Os odontoblastos sintetizam e secretam a MMP-2. Assim esta enzima de origem endógena, poderia também contribuir para a degradação da matriz orgânica mineralizada dos dentes pelos processos de cárie dental. A MMP-2 pode ser liberada do esmalte ou da dentina desmineralizada por bactérias cariogênicas, ou sintetizada e liberada imediatamente por odontoblastos durante o processo carioso (TJÄDERHANE et al., 1998).

A MMP-2 é secretada na forma latente (72KDa) e quando clivada adquire a forma com peso molecular de 59-62 KDa (HANNAS et al., 2007), sendo encontrada em altas concentrações na dentina humana (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007).

A gelatinase A é incorporada na matriz mineralizada da dentina durante a mineralização, mais provavelmente vinculada ao colágeno do que aos cristais de hidroxiapatita. A função da MMP-2 no processo de mineralização ainda não é bem conhecida, entretanto um alvo potencial é a membrana basal abaixo dos odontoblastos, cuja degradação separa os ameloblastos (células formadoras de esmalte) da pré-dentina, sendo este um requisito para a formação do esmalte (LINDE e GOLDBERG, 1993).

3.2.4 Inibidores exógenos das MMPs

A manutenção da adesão dentina-adesivo a longo-prazo é ameaçada pela desagregação da camada híbrida. Dentre as várias causas desta degradação está a ativação das MMPs dentinárias (PASHLEY et al., 2004; BRESCHI et al., 2008; ZHANG e KERN 2009; PASHLEY et al., 2011).

Durante o envelhecimento da restauração, uma fração de 30% do volume da CH que era previamente ocupada por colágeno, é amplamente ocupada pela água, devido à perda de colágeno insolúvel. O colágeno é quebrado pela MMP-8, que é uma collagenase, e o restante da degradação é feita pelas MMP-2 e MMP-9 que são verdadeiras gelatinases (ZHANG e KERN, 2009). A conversão das fibrilas de colágeno insolúveis em peptídeos de gelatina solúveis, causa uma perda da continuidade entre a CH e as fibrilas do colágeno mineralizado existentes no interior da dentina. Isto resulta em perda de retenção da união dente/resina composta (CARRILHO et al., 2007b).

Muitos métodos têm sido sugeridos para alcançar uma adequada infiltração dos monômeros, na tentativa de inibir a quebra das fibrilas colágenas e assim reduzir o envelhecimento da CH pela sorção de água. (ZHANG e KERN, 2009).

Inibidores de proteases como *primers* adicionais podem ser usados para inibir a atividade collagenolítica intrínseca da dentina humana, por reduzir o envelhecimento das interfaces e aumentar a estabilidade das fibrilas colágenas da dentina com a CH. Isto é essencial na adesão dentinária e pode ser alcançado por inibição das enzimas dentinárias derivadas do hospedeiro, as quais são responsáveis pela quebra das fibrilas colágenas sem a ação de bactérias (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a).

A clorexidina (CHX) é um agente antimicrobiano de amplo espectro usado largamente no tratamento de doenças infecciosas orais, é também um potente inibidor de MMPs. Este inibidor inespecífico tem demonstrado propriedades desejáveis de inibição sobre a atividade das MMP-2, MMP-8 e MMP-9, mesmo em baixas concentrações. A mínima concentração requerida para inibir a atividade da MMP-9 é a de 0,002%, já para inibir a MMP-2, apenas 0,0001% é suficiente. Já a MMP-8 pode ser inibida por CHX na concentração de 0,02% (GENDRON et al., 1999). Foi também demonstrado que a atividade collagenolítica de uma dentina pulverizada poderia chegar perto de zero quando tratada com CHX a 0,2% por 60 segundos (PASHLEY et al., 2004; TAY et al., 2006; BRESCHI et al., 2008). Estudos demonstram que a clorexidina pode ser aplicada sobre a dentina desmineralizada após o condicionamento com ácido fosfórico a 37% na cavidade a ser restaurada com resina composta, e logo após, o sistema adesivo é aplicado. Esse procedimento tem produzido um aumento e manutenção da resistência adesiva em testes de microtração, tanto em estudos *in vivo*, quanto *in vitro* (CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b; BRESCHI et al., 2010b). Entretanto, a grande desvantagem da clorexidina é que ela não pode ser co-polimerizada dentro de um sistema adesivo, e assim, não garante maior estabilidade ao polímero formado.

Outros *primers* inibidores de MMPs também estão sendo estudados, como o Galardin (Sigma-Aldrich), (BRESCHI et al., 2010a), também conhecido como Ilomastat

ou GM 6001. Este produto tem demonstrado potencial de inibição similar à CHX, reduzindo a queda da resistência adesiva na interface dentina-adesivo (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007b; BRESCHI et al., 2008). Geralmente, a concentração efetiva dos inibidores específicos de MMPs se encontra na faixa de nanomolaridade. O Galardin, possui uma estrutura semelhante ao colágeno, o que facilita a ligação com o sítio ativo das MMPs e uma estrutura de hidroxamato ($R-CO-NH-OH$, onde R é um resíduo orgânico) o qual quelar íons Zn localizados no domínio catalítico das MMPs. Este inibidor mostrou ser efetivo na inibição da ação da MMP-2 (0,4nM), MMP-3 (0,5nM), MMP-8 (3,7nM) e MMP-9 (0,1nM), porém estas concentrações foram encontradas com enzimas solúveis puras. Entretanto, para o uso contra MMPs endógenas da dentina, as concentrações necessitam ser bem mais altas (BRESCHI et al., 2010a).

À semelhança, o EDTA (FRANÇOIS, 1977) e a Tetraciclina (INGMAN et al., 1993) também são inibidores de MMPs, porém inespecíficos como a CHX.

Outros materiais têm sido estudados para serem usados como *primers*, cuja função é a inibição específica das MMPs 2 e 9. O SB3CT (Sigma-Aldrich) é um inibidor específico de gelatinases, o qual se liga covalentemente ao sítio ativo da enzima e assim bloqueia a atividade gelatinolítica da mesma. Age inibindo apenas as MMPs 2 e 9 e possui sua alta especificidade com uma concentração inibitória mínima na faixa nanomolar, porém não é adequado para o uso em dentina humana (BROWN et al., 2000; DE MUNCK et al., 2009; PASHLEY et al., 2011).

Materiais contendo metais como o zinco também tem demonstrado inibir as gelatinases humanas. Exemplos práticos são o amálgama dental (SOUZA, GERLACH e LINE, 2001) e os cimentos de óxido de zinco (SANTOS et al., 2004), porém estes materiais não participam da composição dos materiais restauradores adesivos contemporâneos. Além disto, o mecanismo de inativação das enzimas por metais não é completamente entendido. Souza, Gerlach e Line, (2001) sugerem que os íons metálicos ligariam-se aos resíduos de aminoácidos, causando mudanças na conformação e inativando a função catalítica das MMPs.

Recentemente um novo monômero contendo zinco, o Metacrilato de Zinco, mostrou fortes evidências de inibição da MMP-2 (HENN et al., 2011). Adicionalmente o TEGDMA (Trietilenoglicol Dimetacrilato) (CARVALHO et al., 2010) e o HEMA (2-hidroxietil dimetacrilato) (CARVALHO et al., 2009), monômeros já utilizados na odontologia, demonstraram também ter potencial inibitório da MMP-2.

3.3 Monômeros metacrilatos

Os materiais adesivos odontológicos têm sua dureza aumentada, quando são polimerizados. A polimerização ocorre por meio de uma série de reações químicas pelas quais a macromolécula ou polímero é formado a partir de um grande número de moléculas conhecidas como monômeros. A polimerização de monômeros metacrilatos produz polímeros reticulados, os quais são aplicados em larga escala na odontologia restauradora adesiva, como em compósitos, sistemas adesivos, cimentos adesivos e selantes de fósulas e fissuras (ANUSAVICE et al, 2005).

Um compósito resinoso tipicamente utilizado consiste em uma matriz orgânica, na qual estão inseridas partículas inorgânicas. Os componentes orgânicos mais comumente usados são o HEMA, o Bis-GMA, o TEGDMA e o UDMA (OGLIARI et al., 2008).

A fim de melhorar o desempenho dos sistemas adesivos, muitas investigações têm sido realizadas, incluindo como principais tópicos, a redução da contração de polimerização, a sorção e a solubilidade em água, além do aumento da biocompatibilidade e do potencial de inibição de MMPs (DE MUNCK et al., 2005; BRESCHI et al., 2008; PASHLEY et al., 2011).

A eficiência e a qualidade da união adesiva à dentina estão relacionadas com a infiltração e a polimerização dos monômeros adesivos. O teor de água na superfície da dentina é imprevisível, tornando o processo de adesão muito complexo. Em adesivos à

base de BisGMA e HEMA a presença de água na superfície pode causar a separação de fases entre os monômeros hidrofílicos dos hidrofóbicos e inibir a relativa infiltração do monômero hidrofóbico, afetando a integridade da interface adesivo/dentina. Complicações com as separações de fase têm sido associadas com adesivos à base de BisGMA na presença de dentina desmineralizada molhada. A distribuição heterogênea dos adesivos e/ou o colapso da rede de colágeno comprometem a integridade da camada híbrida, a estabilidade marginal e a resistência da adesão (SPENCER e WANG, 2002; PASHLEY et al., 2011).

Os monômeros metacrilatos surfactantes avaliados neste estudo se caracterizam basicamente pela presença de dois radicais metacrilatos correspondendo ao grupo hidrofóbico e longas cadeias de óxido de etileno ($[-CH_2-CH_2-O-]_n$) que são a parte hidrofílica da molécula. Estas longas cadeias estendidas de óxido de etileno propiciam grande flexibilidade a estes materiais, melhorando a mobilidade de todo o sistema (Fig. 2). Monômeros com maiores unidades de óxido de etileno apresentam os maiores valores de grau de conversão e de densidade de cadeias cruzadas (OGLIARI et al., 2008).

Estes materiais têm a característica de reduzir a tensão de superfície, tornando mais fácil a mistura entre dois líquidos. São componentes orgânicos ambifílicos, pois contém tanto grupos químicos hidrofílicos quanto hidrofóbicos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos. Este comportamento bipolar é muito importante para a melhora dos sistemas adesivos, pois possibilita menor hidrólise devido à formação das ligações cruzadas, sem a perda de massa, produzindo melhora na penetração das fibrilas desmineralizadas de colágeno na CH (ZANCHI et al., 2011).

Tais cadeias longas podem propiciar a formação de éteres de coroa, que poderiam inativar as MMPs através da ligação com o zinco existente no sítio catalítico e assim neutralizar a ação gelatinolítica da enzima (CARVALHO et al., 2010).

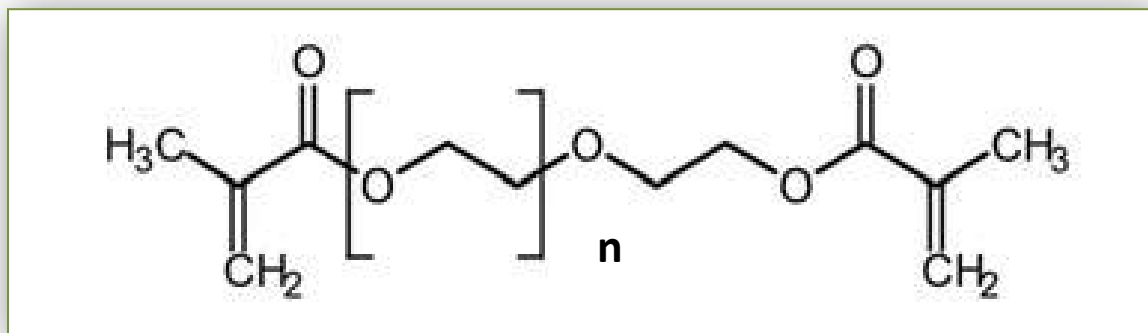


Figura 2 – Estrutura molecular dos monômeros dimetacrilatos, onde **n** é o número de cadeias de óxido de etileno existentes em cada um dos monômeros testados. Nas extremidades os 2 grupamentos metacrilatos. Quanto maior o **n**, maior o peso molecular da substância. Fonte – Essetech, Inc.

Um monômero surfactante amplamente utilizado na composição de materiais adesivos é o TEGDMA. Este monômero bi-funcional com cadeias de ligações cruzadas presente em grande quantidade em materiais dentários poliméricos como resinas compostas e adesivos, é usado como um monômero diluente devido a sua propriedade de baixa viscosidade. Carvalho et al., (2010) já demonstraram o potencial de inibição da MMP-2 pelo TEGDMA, devido a sua estrutura molecular que pode formar éteres de coroa com o cátion bivalente presente no domínio catalítico da MMP-2.

Ordenadamente por peso molecular, os monômeros surfactantes testados no presente trabalho foram o Etilenoglicol Dimetacrilato (EGDMA), Trietilenoglicol Dimetacrilato (TEGDMA), Tetraetilenoglicol Dimetacrilato (T4GDMA), Polietilenoglicol Dimetacrilato 200 (PEG200DMA) e Polietilenoglicol Dimetacrilato 400 (PEG400DMA). Estes monômeros diferem apenas na quantidade de cadeias de óxido de etileno, pois todos possuem na sua extremidade dois grupamentos metacrilatos (Fig. 2).

Tabela 1 – Comparação de propriedades físico/químicas dos monômeros metacrilatos usados neste estudo

	<i>PESO MOLECULAR</i>	<i>VISCOSIDADE</i>	<i>FLEXIBILIDADE</i>	<i>SOLUBILIDADE EM ÁGUA</i>	<i>IRRITAÇÃO PELE</i>	<i>RESISTÊNCIA À ABRASÃO</i>
EGDMA	198,22	Baixa	Boa	Baixa	Baixa	Boa
TEGDMA	286,32	Baixa	Boa	Boa	Baixa	Boa
T4GDMA	330,37	Baixa	Boa	Boa	Baixa	Boa
PEG200DMA	330,37	Média	Boa	Boa	Baixa	Boa
PEG400DMA	550,64	Baixa	Boa	Boa	Baixa	Boa?

Fonte : Esstech, Inc e rad-solutions, llc.

3.3.1 Características físico-químicas dos Monômeros Metacrilatos

(Fonte – ESSTECH, INC e RAD-SOLUTIONS, LLC).

EGDMA= atua como agente de ligação cruzada. Este monômero bifuncional tem reatividade semelhante à do metacrilato de metila, além de baixa absorção em água. É útil como agente de muitas ligações cruzadas puras com capacidade de efetuar ligações especializadas entre cadeias poliméricas.

TEGDMA= é um monômero bifuncional, o qual tem sido usado em larga escala na formulação de adesivos odontológicos e, tem absorção em água ideal e propriedades de estabilidade.

T4GDMA= A adição de um óxido de etileno no TEGDMA aumentou sua reatividade e sua absorção em água. Ele pode ser usado como componente principal em adesivos odontológicos anaeróbios.

PEG200DMA= Usado como base em selantes e adesivos, atua como um agente de ligações cruzadas, possui baixa viscosidade, resistência de impacto e baixa toxicidade.

PEG400DMA= Tais moléculas de óxido de etileno adicionadas a este adesivo odontológico aumentam sua reatividade e também são monômeros bifuncionais.

PEGnDMA= Polietilenoglicol é uma condensação de polímeros de óxido de etileno e água com fórmula geral $H(OCH_2CH_2)_nOH$, onde n é o número médio de repetições dos grupamentos de oxietileno.

Os membros de baixo peso molecular com n (número de cadeias intermediárias de óxido de etileno) de 2 a 4 são: Dietilenoglicol, Trietilenoglicol e Tetraetilenoglicol respectivamente, os quais são produzidos como compostos puros. Os compostos de baixo peso molecular (até 700) são líquidos viscosos inodoros, incolores, com um ponto de congelamento de $-10^{\circ}C$ (dietileno glicol). Já os compostos poliméricos com alto peso molecular (a partir de 1.000) são sólidos como cera, com ponto de fusão até $67^{\circ}C$. [A abreviação (PEG) possui uma combinação com um sufixo numérico que indica o peso molecular médio]. PEGs são solúveis em água, e também em muitos solventes orgânicos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos (não alifáticos).

3.3.1 Biocompatibilidade dos monômeros metacrilatos

A biocompatibilidade de um material é a capacidade de resposta biológica adequada do mesmo, não sendo simplesmente uma propriedade inerente ao material. A biocompatibilidade depende das condições do hospedeiro, das propriedades do material e do contexto em que o material é usado. Das respostas biológicas aos

materiais, a toxicidade é a primeira resposta estudada. Os testes *in vitro* são realizados fora do organismo, onde o material ou um extrato do material é colocado em contato com algum sistema biológico. Tais testes *in vitro* podem ser divididos em testes que mensuram o crescimento ou morte celular, em testes que determinam a função celular de algum tipo, e ainda nos que avaliam a integridade do material genético da célula (ANUSAVICE, 2005).

Os testes *in vitro* têm várias vantagens sobre os ensaios em modelo animal dentre elas estão a rapidez com que podem ser feitos, fácil reprodutibilidade e relativo baixo custo. As condições para a realização dos testes podem ser controladas para fornecer a qualidade do maior rigor científico, facilitando sua reprodutibilidade. Sua maior desvantagem é a potencial falta de relevância destes ensaios *in vitro* com relação ao material de estudo e sua aplicabilidade clínica. O ambiente *in vitro* carece da complexa coordenação do sistema que está presente em um organismo, como a imunidade, a inflamação e a circulação (GEURTSSEN, 2000).

Já as reações mutagênicas ocorrem quando os componentes de um material alteram a sequência de pares de bases do DNA na célula. Estas alterações são chamadas de mutações, e podem ser causadas pelas interações diretas entre uma substância e o material genético, ou indiretamente pelas alterações nos processos celulares que mantêm a integridade do DNA (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; MANTEUCA et al., 2006).

Materiais odontológicos resinosos têm sido identificados por apresentar algum potencial mutagênico. Contudo, a mutagenicidade não significa carcinogenicidade (capacidade de causar tumores) porque muitas mutações são reparadas e outras são até irrelevantes para causar doenças (ANUSAVICE et al., 2005).

Geurtsen (2000), em sua revisão sobre biocompatibilidade de materiais restauradores mostra que devido à degradação ou corrosão, muitos componentes são lixiviados dos materiais restauradores adesivos para o ambiente oral, fato que pode

influenciar a biocompatibilidade. Antes da aplicação clínica, cada material restaurador deve passar por testes padronizados para avaliar sua biocompatibilidade.

Autian (1974), estruturou uma abordagem para padronizar estes testes sugerindo 3 etapas consecutivas: testes de triagem (toxicidade não específica); teste em animais (toxicidade específica) e estudos clínicos com seres humanos.

As culturas celulares derivadas de animais e de humanos têm sido usadas há muito tempo para determinar os efeitos de citotoxicidade dos materiais restauradores. Linhagens permanentes (imortalizadas) e linhagens de cultura primária derivadas dos tecidos bucais são usadas. Geralmente as células de linhagens permanentes as quais são cultivadas por anos, mostram mais homogeneidade na sua morfologia e fisiologia. Ao contrário, células derivadas de cultura primária, as quais são originadas de tecidos bucais, simulam bem mais as condições que podem ocorrer *in vivo*, à semelhança dos tecidos dos quais foram originadas (GEURTSEN et al., 1998; FRESHNEY, 2000).

A genotoxicidade e a carcinogenicidade são importantes parâmetros que podem ter impacto na compatibilidade sistêmica dos materiais. A genotoxicidade significa a presença de uma substância DNA-reativa que pode ser mutagênica ou carcinogênica, e devido as suas consequências, são testes de extrema importância (GEURTSEN, 2000).

Um teste que demonstra alterações genéticas nas células é o ensaio de MN, que é utilizado como um marcador biológico para avaliar o grau de comprometimento das células. Eles somente se expressam em células que completaram pelo menos uma divisão celular, após sofrerem ação do agente genotóxico. Frequentemente a não incorporação destes fragmentos ocorre por não possuírem centrômero, e por isto não conseguirem migrar em direção aos pólos do fuso, permanecendo atrasados na anáfase. Estes fragmentos de DNA deixados para trás são incorporados dentro de núcleos secundários, permanecendo no citoplasma celular (FENECH, 2000).

O principal mecanismo responsável pela indução de micronúcleos (MN) é a quebra da fita dupla de DNA, durante a divisão celular, levando à formação de pequenos núcleos, bem menores que o original com fragmentos acêntricos e falha dos

aparatos mitóticos, resultando em MN com fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros em seu interior (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). Na telófase, um envelope se forma ao redor do fragmento ou do cromossomo inteiro, o qual se desenrola e gradualmente assume a forma de um núcleo interfásico, mas bem menor que o núcleo principal da célula (FENECH, 2000).

Agentes genotóxicos geram uma variedade de lesões, incluindo a geração de DNA único ou quebras da fita dupla. Em resposta, um elaborado sistema molecular regulador é ativado para manter a integridade genômica celular. O sucesso completo das fases do ciclo das células eucarióticas G1, S, G2 é precisamente monitorado por vários *check-points* do ciclo celular. Nestes pontos, o ciclo celular pode ser bloqueado para iniciar a reparação de danos ao DNA ou para ativar a morte celular programada (apoptose). Entretanto, defeitos nestes “pontos de controle de sinalização” do ciclo celular, são desastrosos para a integridade do genoma, pois eles podem levar a danos celulares irreversíveis, como mutações genéticas ou lesões cromossômicas (SCHWEIKL, SPAGNUOLO, SCHMALZ, 2006).

Como consequência do mecanismo aeróbico das células, pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) são constantemente geradas nas células e nos tecidos. Antioxidantes celulares, como a Glutadiona (GSH) agem para harmonizar e desintoxicar as células contendo estas moléculas reativas, mas quando o balanço entre oxidante e anti-oxidante é interrompido, uma condição referente aos estresse oxidativo inicia. Caso haja persistência do estresse oxidativo, ocorrem danos desta natureza aos lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos acumulados e eventualmente resulta em efeitos biológicos que levam à alterações nas vias de transdução de sinal e transformação na expressão genética celular, com mutações e morte da célula (SCHWEIKL, SPAGNUOLO e SCHMALZ, 2006; DEMIRCI et al., 2008).

A avaliação do dano à membrana celular, a inibição da atividade enzimática ou proteica, a síntese de DNA e RNA, ou a simples estimativa do número de células sobreviventes após o tratamento, são indicadores usados para descrever as

modificações nas funções básicas das células (SCHWEIKL, SPAGNUOLO, SCHMALZ, 2006; DEMIRCI et al., 2008).

A matriz orgânica dos monômeros resinosos tem sido reconhecida como a fonte dos compostos causadores de uma grande variedade de reações biológicas adversas. Monômeros resinosos também foram identificados como produtos químicos capazes de perturbar o equilíbrio de redox celular estável, resultando em um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e subsequente morte celular por apoptose (SPAGNUOLO et al., 2004; SCHWEIKL et al., 2006; SCHWEIKL et al., 2007; DEMIRCI et al., 2008; CHANG et al., 2010).

Além disso, elevados níveis de ROS mediam também os efeitos genotóxicos. As metades carbonila dos acrilatos e metacrilatos adjacentes à ligação dupla carbono-carbono funcionam como grupos retirantes de elétrons. Consequentemente o carbono beta da ligação dupla permanece com carga positiva e pode reagir diretamente com centros nucleofílicos em moléculas como o DNA e proteínas, bem como pequenas moléculas celulares como a Glutathione (GSH) (SCHWEIKL, SPAGNUOLO, SCHMALZ, 2006; DEMIRCI et al., 2008).

Monômeros como TEGDMA podem induzir mutações por um mecanismo secundário de geração de ROS, de forma semelhante às provenientes da radiação ionizante, ultravioleta, bem como aquelas presentes em determinados produtos químicos, nos quais ROS são os principais agentes responsáveis pelo dano endógeno ao DNA (SCHWEIKL, SPAGNUOLO e SCHMALZ, 2006; DEMIRCI et al., 2008).

Monômeros resinosos também tem induzido o estresse oxidativo através da formação de ROS em células oriundas de tecidos orais em cultivo (STANISLAWSKI et al., 2003; REICHL et al., 2006; KRIFKA et al., 2011) que vai além da capacidade de regulação-redox das células em cultura derivadas de tecidos orais. Este desequilíbrio na homeostase redox causada por monômeros como TEGDMA e HEMA, pelo menos em parte, é uma consequência da redução do sistema anti-oxidante intracelular, no qual há a diminuição da quantidade de Glutathione (GSH). Na presença de pequenos

monômeros como TEGDMA ou HEMA, mesmo em baixas concentrações, o aumento dos níveis intracelulares de ROS está associado à modificação dos caminhos reguladores da sobrevivência da célula, proliferação, ou apoptose (KRIFKA et al., 2011).

4 Materiais e métodos

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório NCT-BIO, da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

4.1 Técnica de extração da MMP-2 da dentina

A técnica de extração da MMP-2 do tecido dentinário foi adaptada do protocolo estabelecido pelo estudo clássico de Martin De Las Heras et al., (2000).

Quinze terceiros molares hígidos indicados para extração foram obtidos de pacientes jovens (idade entre 17 e 21 anos) e saudáveis. Os dentes foram usados no máximo em 1 mês após as extrações. Parte dos dentes foi obtida de pacientes usuários das clínicas da disciplina de cirurgia da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Pelotas e parte de pacientes de clínicas particulares. Os pacientes assinaram termo de consentimento e doação de dentes, livre e esclarecido (anexo B) e este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética desta universidade, sob o parecer de número 026/2008 (anexo A), obedecendo às exigências da legislação brasileira, conforme as resoluções do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96 e 34/05, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos.

Imediatamente após a cirurgia, os dentes foram lavados em PBS e acondicionados em um tubo de ensaio contendo meio de cultivo (DMEM puro), a 4°C (Fig. 3a). Pontas diamantadas (KG 4138) em alta rotação, com água destilada resfriada, foram utilizadas para remover o esmalte coronário até a região do limite amelo-dentinário (Fig. 3b).

A coroa foi separada da porção radicular com o auxílio de um disco diamantado, curetas (SS White Duflex, nº 17) estéreis e afiadas foram utilizadas para remover os restos de tecido pulpar. A seguir, a dentina coronária foi cortada em fatias de aproximadamente 0,8mm de espessura, (fig. 3c) em cortadeira de precisão utilizando disco de corte diamantado (Wafering Blade, BuehlerLtd., Lake Bluff, IL, EUA) acoplado a cortadeira metalográfica de precisão (Isomet 1000 PrecisionSaw, BuehlerLtd., Lake

Bluff, IL, EUA), com velocidade de corte de 400 rpm. Essas fatias foram armazenadas secas, em nitrogênio líquido por 24 horas, e a obtenção de um pó de dentina foi conseguido pela moagem manual em gral de porcelana (fig. 3d). Após este processo, o pó foi passado por peneira de 40 μ m.

Foram usados 3,9g de dentina, e colocados em um tubo de fundo cônico (Tipo Falcon, 15ml) e adicionado 14ml de solução de 2,5M NaCl (Synth) e 45 μ l de inibidores de proteases (IP) (Sigma Aldrich). O conteúdo ficou sob agitação constante a 4°C, *overnight*. Esta solução de NaCl (Synth) visa fazer uma lavagem inicial do conteúdo de dentina e os IP (Sigma Aldrich) são importantes para que as proteínas posteriormente extraídas não sejam perdidas por auto-degradação, ou sejam lisadas por outras enzimas (SANTOS et al., 2009).

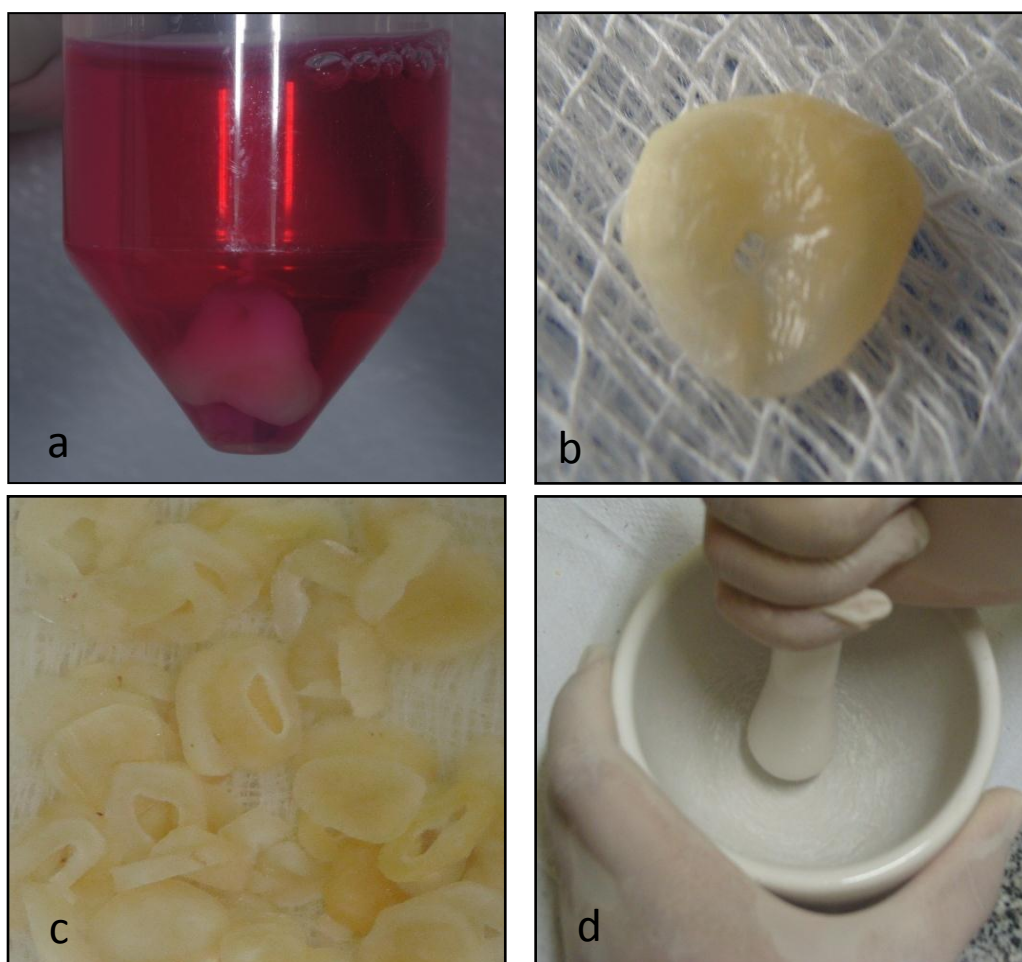


Figura 3 - Terceiro molar armazenado em meio de cultivo à 4°C (a); coroa dentária com esmalte já removido (b); dentina coronária em fatias de 0,8mm (c); moagem manual das fatias de dentina (d).

Após a lavagem inicial, uma segunda lavagem do pó de dentina foi executada, mas desta vez com água destilada refrigerada. Foi feito a centrifugação deste pó de dentina, removido o sobrenadante e a dentina pulverizada lavada foi então, colocada em um frasco e adicionado 6ml de uma solução contendo 4M Guanidina-HCl (Sigma Aldrich), 65mM Tris-HCl (Vetec) e inibidores de proteases (Sigma Aldrich). O uso da Guanidina visa otimizar a extração das proteínas da matriz dentinária, uma vez que o conteúdo de MMPs na dentina é reduzido, e se faz necessária uma correta extração, para que sejam visualizadas posteriormente nos géis de poliacrilamida.

Esta solução com a dentina foi mantida sob agitação constante a 4°C, por 48 horas e, após este primeiro ciclo, a solução foi submetida à centrifugação (Centrífuga Microprocessa, Quimis) a 2000g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o *pellet*, submetido a outro ciclo com a solução de Guanidina-HCl (Sigma Aldrich), nas mesmas condições por 48 horas. Centrifugado novamente, retirado o sobrenadante e o *pellet* submetido à desmineralização em 4,5ml de solução de EDTA (Synth) a 0,5M (pH 7,4), adicionado à 45µl de IP (Sigma Aldrich), na temperatura de 4°C, sob agitação constante por 96h (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; SANTOS et al.; 2009).

Após este período a amostra foi centrifugada a 2000g por 10 minutos, o sobrenadante coletado (extrato E1) e armazenado à - 80°C (Freezer Indrel/ IULT 335D). Este ciclo foi repetido por mais 3 vezes, a cada 96h, dando origem aos extratos classificados como E1, E2, E3 e E4. Após o último ciclo de desmineralização as alíquotas das amostras foram liofilizadas (Liofilizador L101, Liotop) sendo este procedimento de liofilização realizado na Faculdade de Biotecnologia da UFPel. Cada alíquota de 1,6ml do extrato E1, E2, E3 e E4 e outra alíquota contendo 400µL de cada um dos extratos (extrato T), totalizando também os 1,6ml, foram armazenadas à -80°C (Freezer Indrel/ IULT 335D) até o momento dos experimentos.

4.2 Quantificação proteica

As alíquotas anteriormente liofilizadas foram solubilizadas em 500µl de PBS estéril (Gibco/Invitrogen, Lote: 835185). Esta diluição visa a quantificação das proteínas, para que fosse possível usar a mesma quantidade em peso para cada amostra, na corrida do gel de Poliacrilamida/SDS (SDS/PAGE). A quantificação foi feita pelo método de Espectrofotometria por Absorção Ultravioleta a 280nm em biofotômetro (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Germany) (NOBLE e BAILEY, 2009).

Este método produz uma estimativa da concentração proteica existente em uma determinada amostra, comparadas com um padrão de calibração feita com albumina

sérica bovina (BSA) (BioAgency, lote: 75610A) 2mg/ml. Primeiramente foi feito o preparo de uma curva de calibração. Diluições seriadas foram feitas a partir da concentração de 2mg/ml de BSA com água Mili-Q: 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml e 0,125mg/ml. Obtém-se uma curva de calibração com o BSA a partir de um padrão branco (zero) que consiste apenas da adição do solvente em que a amostra foi eluída (PBS), com base na absorbância de 280nm. Após ter sido feito a calibração do Biofotômetro, 10µl de cada amostra [E1, E2, E3, E4 e T(todas)] foram eluídos em 190 µL de PBS e comparados com a curva padrão de BSA.

Após o cálculo, o valor encontrado foi multiplicado por 20 (fator de diluição) para obtenção da concentração final de cada extrato. As amostras que continham uma maior quantidade de proteína foram os extratos E3 e E4 e T. Estes foram misturados e novamente procedeu-se a quantificação. Alíquotas foram obtidas para o uso em cada gel de zimografia e congeladas a -80°C (Freezer Indrel/ IULT 335D), até o uso. Para a corrida no gel de zimografia foram colocados em cada poço 15µl da amostra, o que correspondeu a aproximadamente 180µg/proteína por poço.

4.3 Zimografia

Esta técnica consiste no uso da eletroforese, no qual um substrato proteico, geralmente a gelatina, é co-polimerizado com acrilamida. As enzimas são separadas sob condições não redutoras, renaturadas e então incubadas em tampão adequado, baseando-se na associação entre digestão do substrato e verificação do peso molecular das proteases. Após, o gel é corado com Coomassie Blue e a presença da enzima é verificada pela ausência de coloração (formação de bandas) nas áreas onde o substrato foi degradado (ALBERTS et al., 2011). A atividade proteolítica foi examinada em gel de poliacrilamida a 10%, contendo 0,05% de gelatina.

4.3.1 Preparo do gel de separação e gel de largada

Primeiramente foi confeccionado o gel de separação (quadro 1), o qual foi colocado entre duas placas de vidro de 10x10cm (BioAgency) com o auxílio de uma pipeta sorológica e aguardados 30 minutos para a completa polimerização, em temperatura ambiente. Este gel é confeccionado com a adição de gelatina para que sirva de substrato digerível pelas gelatinases.

Após a polimerização do gel de separação, foi iniciada a confecção do gel de largada (quadro 1), e colocado sobre o primeiro, juntamente com o pente para a formação dos poços de inserção das amostras e armazenado a 4°C *overnight*.

4.3.2 Corrida e incubação dos géis

As alíquotas contendo a quantidade suficiente para 11 poços de um gel foram retiradas do freezer -80°C (Freezer Indrel/ IULT 335D) alguns minutos antes da eletroforese. As amostras contendo as proteínas foram misturadas ao tampão da amostra (4X) (100mM de Tris-HCl, pH 6,8 (Vetec); 4% de SDS, (Vetec); 20% de glicerol (Vetec); 200µg/mL de azul de bromofenol (Vetec)) na proporção de 1:5. As

amostras/tampão foram incubadas à 36°C por 10 minutos e logo a seguir, foram delicadamente adicionada aos poços do gel de largada com o auxílio de uma micropipeta, 15µl/poço.

As amostras foram submetidas à eletroforese em condições não redutoras (Dodecil Sulfato de Sódio, SDS) e a corrida realizada com a amperagem fixa em 0,02A, demorando em média 4 horas.

Logo após ao término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado dos vidros e transferido para um reservatório contendo Triton 2% (Quadro 2), sob suave agitação por 30 minutos, este procedimento foi repetido.

Por último, o gel foi cortado em tiras de aproximadamente 1cm e cada tira foi incubada em tampão de incubação (Quadro 2) contendo EDTA (Synth), um inibidor de MMPs, NEM (Fluka, BioChemika), um inibidor de proteases serinas e as diferentes concentrações de cada monômero testado, as quais serão relatadas a seguir. O tampão contendo as tiras do gel teve o pH ajustado para 7,4 e cada gel foi incubado a 37°C, por 48 horas, para determinar a atividade gelatinolítica da MMP.

Quadro 1 – Descrição dos reagentes dos géis de poliacrilamida.

Reagente/Solução	Fabricante	Gel de separação	Gel de largada
Água destilada	--	3,33ml	1,66ml
30% Acrilamida + 0,8% Bisacrilamida	Vetec* e Invitrogen +	4ml	0,66ml
Tampão do gel de separação (Tris-HCl) pH 8,8	Vetec*	2,66ml	--
Tampão do gel de largada (Tris-HCl) pH 6,8	Vetec*	--	0,66ml
Gelatina	Vetec*	100µl	--
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	Vetec*	33,33µl	3,33µl
Persulfato de amônio 20%	Vetec*	66,66µl	17µl

* Duque de Caxias - RJ

+ São Paulo - SP

4.3.3 Controles

Como controle negativo da atividade gelatinolítica, uma tira de cada gel de poliacrilamida, foi incubada somente em tampão de incubação Tris-CaCl₂ (Quadro 2) por 48 horas. Foi usado um controle para cada ensaio. Como controle positivo foi usado EDTA, um conhecido inibidor de MMPs.

4.3.4 Padrão de peso molecular

Em um dos poços do gel de poliacrilamida foi adicionado 5µl de um padrão de peso molecular para que se pudesse comparar com o peso molecular da enzima estudada. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™, Cat 10747-012, (Invitrogen®, Carlsbad, USA).

4.3.5 Identificação da MMP por inibição química específica

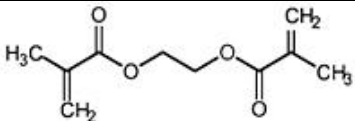
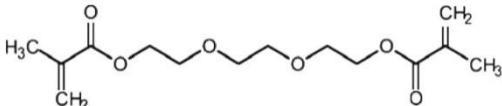
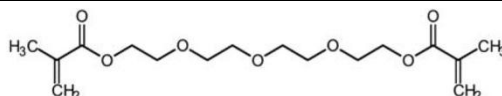
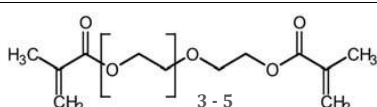
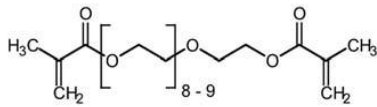
Para identificar as enzimas presentes no meio condicionado, experimentos paralelos de inibição foram realizados. Duas tiras de cada gel contendo gelatina foram incubadas em tubos Tipo Falcon de 45ml, em tampão Tris-CaCl₂ a 37°C por 48 h. Em tubo específico foi adicionado 0,5 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético- Synth) um conhecido e poderoso inibidor de MMPs, assim como para 0,05mM de NEM (N-ethyl-maleimide- Fluka, BioChemika) que foi usado para inibir a atividade das proteinases serinas.

4.3.6 Inibição da MMP-2 pelos monômeros-teste

Para examinar o efeito dos diferentes tipos e concentrações de monômeros na atividade enzimática, após a eletroforese, os géis foram cortados em tiras de aproximadamente 1cm e cada tira incubada a 37°C por 48h em tampão Tris-CaCl₂ (Quadro 2) contendo cada uma das concentrações de cada monômero testado (5mM, 1mM, 0,1mM, 0,01mM e 0,001mM). Após a adição dos monômeros no tampão de incubação, o pH foi ajustado para 7,4 e os géis, incubados a 37°C, por 48h. A tabela 2 mostra os monômeros metacrilatos usados no presente estudo.

4.3.7 Monômeros metacrilatos usados neste estudo (Tabela 2):

Tabela 2 - Peso, fórmula e estrutura molecular dos diferentes monômeros

Monômeros	Peso Molecular (KDa)	Fórmula molecular	Estrutura Molecular
Etilenoglicol di-metacrilato (EGDMA)	198,22	$C_{10}H_{14}O_4$	
Trietilenoglicol di-metacrilato (TEGDMA)	286,32	$C_{14}H_{22}O_6$	
Tetraetilenoglicol di-metacrilato (T4GDMA)	330,37	$C_{16}H_{26}O_7$	
Polietilenoglicoldi-metacrilato 200 (PEGDMA 200)	330,37	$C_{14-18}H_{22-30}O_{6-8}$	
Polietilenoglicoldi-metacrilato 400 (PEGDMA 400)	550,64	$C_{26-28}H_{46-50}O_{12-13}$	

Fonte: Esstech, Inc. Essington, PA, USA.

Quadro 2 – Reagentes e respectivas quantidades para o uso na zimografia.

A – Tampão de corrida		
Reagente / Solução	Fabricante	Quantidade
Glicina	Vetec	36g
SDS	Vetec	2,5g
Tris-Base	Vetec	7,55g
Água destilada	--	qsp 500ml
*Diluir 1:4 na hora do uso, não é necessário ajustar pH		
B - Tampão de Incubação		
Reagente / Solução	Fabricante	Quantidade
CaCl ₂	Synth	1ml
Tris HCl (1M)	Vetec	2ml
Água destilada	--	197ml
* Ajustar pH 7.4		
C - Solução Triton 2%		
Reagente / Solução	Fabricante	Quantidade
Triton X-100	Vetec	10ml
Água destilada	--	500ml
* A água deve ser quente		
D - Solução Corante		
Reagente / Solução	Fabricante	Quantidade
Metanol	Vetec	50%
Ácido Acético	Synth	25%
Azul de Coomassie R250	Vetec	0,1%
E - Solução Descorante		
Reagente / Solução	Fabricante	Quantidade
Metanol	Vetec	30%
Ácido Acético	Synth	10%
Água destilada	--	qsp 1000ml
F - Tampão não redutor (amostra)		
Reagente / Solução	Fabricante	Quantidade
Tris-HCl/SDS pH 6,8	Vetec	7ml
Glicerol	Vetec	3ml
Azul de Bromofenol	Vetec	1,2mg
SDS	Vetec	1g
*Aliquotar para o uso		

4.3.8 Coloração e descoloração dos géis

Após o período de incubação, o tampão foi substituído em cada Falcon por 40ml de 0,05% de Azul de Coomassie (Vetec) (Quadro 2), por aproximadamente 8 horas, e depois descorados com solução descorante de metanol/ácido acético (Quadro 2), por 60 minutos. Após a adição do descorante, as proteínas com atividade gelatinolítica foram visualizadas como bandas negativas. Os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos por duas vezes.

4.3.9 Digitalização das imagens

Para quantificar a inibição relativa da MMP pelos diferentes tipos e concentrações dos monômeros as bandas foram escaneadas, digitalizadas e analisadas com o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). A quantificação foi feita através do percentual da digestão enzimática. A imagem foi convertida para uma escala de cinza e a densidade da banda foi calculada com a remoção do *background*, para impedir a influência na densidade de cada pixel da banda. O percentual da inibição da atividade enzimática foi relacionado com o tipo e concentração do monômero.

4.4 Cultivo celular

Para os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade dos diferentes monômeros estudados foram usadas duas linhagens celulares, uma imortalizada de fibroblastos de camundongos 3T3/NIH e outra, uma cultura primária de fibroblastos pulpaes humanos (FPH).

4.4.1 Cultivo da linhagem celular 3T3/NIH

Os fibroblastos de camundongos de uma linhagem imortalizada 3T3/NIH (fig. 4) provenientes do Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas (NCT-BIO/FOUFPel) foram utilizados para os experimentos.

O tubo de criogenia graduado de 4,5ml (Techno Plastic, ref 89050) contendo a linhagem celular 3T3/NIH foi levado à temperatura de 37°C através da parcial imersão em Banho-Maria (Biopar, Mod BM 03) por 5 minutos e a seguir, dentro de capela de fluxo laminar vertical, o conteúdo foi adicionado a uma garrafa de cultivo celular de 25cm² (Techno Plastic Products), a qual já continha 5ml de DMEM completo à temperatura de 37°C.

A garrafa de cultivo foi colocada em estufa de 5% CO₂ à 37°C por um período de 3 horas para promover a adesão celular no fundo da mesma. Por fim, novo meio de cultura (DMEM, completo) foi adicionado à linhagem celular e esta permaneceu em atmosfera 5% CO₂, à 37°C, até obter-se a confluência de aproximadamente 70% da superfície cultivável da garrafa. Os mesmos procedimentos de subcultura descritos acima foram utilizados para os FPHs.

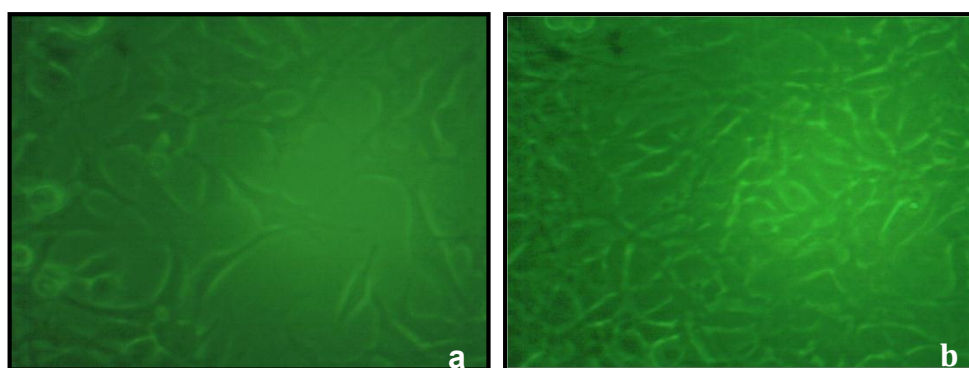


Figura 4 - Fibroblastos imortalizados (3T3/NIH), em confluência 40% (a) e em confluência 70% (b), forma estrelada (aumento de 40X (a) e 10X (b)).

4.4.2 Técnica de cultivo primário - Fibroblastos pulpaes humanos (FPH)

Para o estudo da citotoxicidade dos monômeros foi estabelecida uma linhagem celular primária de fibroblastos pulpaes humanos (FPH) pela técnica de *explants* (FRESHNEY, 2000). A linhagem celular foi estabelecida no Laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (NCT-BIO/FO – Núcleo de Biologia Celular e Tecidual).

Polpas dentárias foram obtidas de terceiros molares hígidos provenientes de doadores jovens e saudáveis. Os terceiros molares apresentavam rizogênese incompleta e ápice aberto e foram indicados para extração por motivos terapêuticos. Os pacientes assinaram termo de consentimento e doação de dentes, livre esclarecido (Anexo B). Imediatamente após as extrações dentárias, os dentes foram armazenados em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco/Invitrogen–Lote: 563487) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco/Invitrogen-Lote: 210120) e 1% de antibiótico (estreptomicina/penicilina, Gibco/Invitrogen-Lote: 847143).

Sob refrigeração foram transportados ao Laboratório de Cultivo Celular, no qual, em capela de fluxo laminar vertical (Quimis/ Série 041109), os dentes foram limpos em PBS (Tampão Fosfato Salino, Gibco/Invitrogen-Lote:558182) e todo o tecido gengival removido com lâminas de bisturi estéreis. As polpas dentais foram removidas dos ápices radiculares com o auxílio de curetas (SS White Duflex) e limas endodônticas (tipo Hedstroem - 2ª série - Maillefer – Dentsply), também estéreis.

As polpas foram lavadas duas vezes em PBS e cortadas sobre placa de Petri estéril com o auxílio de duas lâminas de bisturi até que a obtenção de pequenos fragmentos com aproximadamente 1mm². Após os fragmentos pulpaes foram colocados cuidadosamente sobre a superfície cultivável de uma garrafa de cultura de 25cm² (Techno Plastic Products) e feita a adesão dos tecidos na superfície da garrafa, e após, foi adicionado 1ml de meio de cultivo (DMEM + 10% de SFB + 1% de antibiótico) para promoção da adesão dos *explants*.

Os fragmentos foram mantidos em garrafas de cultivo celular com Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco/Invitrogen–Lote: 563487) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco/Invitrogen-Lote:210120) e 1% de antibiótico

(estreptomicina/penicilina, Gibco/Invitrogen-Lote: 847143) em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C (Thermo Electron Corporation).

Nas primeiras 72 horas os *explants* permaneceram em repouso sem nenhum movimento nos frascos. Após este período, as garrafas foram monitoradas diariamente em microscópio de luz invertida (modelo AAKER) para a observação da migração das células a partir do tecido pulpar. A cada 48/72 horas, 1ml de DMEM completo era adicionado cuidadosamente e os fragmentos não aderidos, removidos. Após o início da migração das células (Fig. 5, a-c), os *explants* foram descartados e as células mantidas até a confluência na garrafa de cultivo, sempre em atmosfera de 5% CO₂ à 37°C.

O crescimento celular isolado foi monitorado diariamente em microscópio de luz invertida (modelo AAKER) e o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular, até a obtenção da subconfluência (Fig. 5 d-f).

4.4.3 Subcultivo

Para o subcultivo, o meio de cultura da garrafa foi removido e reservado em um tubo de centrifugação (Falcon). A monocamada celular foi lavada uma vez com 2ml de PBS (Tampão Fosfato Salino, Gibco/Invitrogen-Lote:558182), pH 7,2 para remover traços do SFB que poderia inativar a Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco/Invitrogen-Lote: 794994).

Em seguida, as células foram separadas entre si e do fundo do frasco com 2 ml/garrafa de tripsina durante 5 minutos, à 37°C e, a tripsina inativada com o meio de cultura contendo SFB reservado anteriormente. Alíquotas dessa suspensão de células foram distribuídas em 2 novas garrafas de 25cm² contendo 5ml de meio de cultivo suplementado com SFB a 10% e as garrafas de cultivo foram mantidas em estufa, à temperatura de 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Cada procedimento de subcultura originou uma nova passagem da linhagem celular. As células usadas para os testes de viabilidade celular e genotoxicidade estavam entre a 5^a e 10^a passagens.

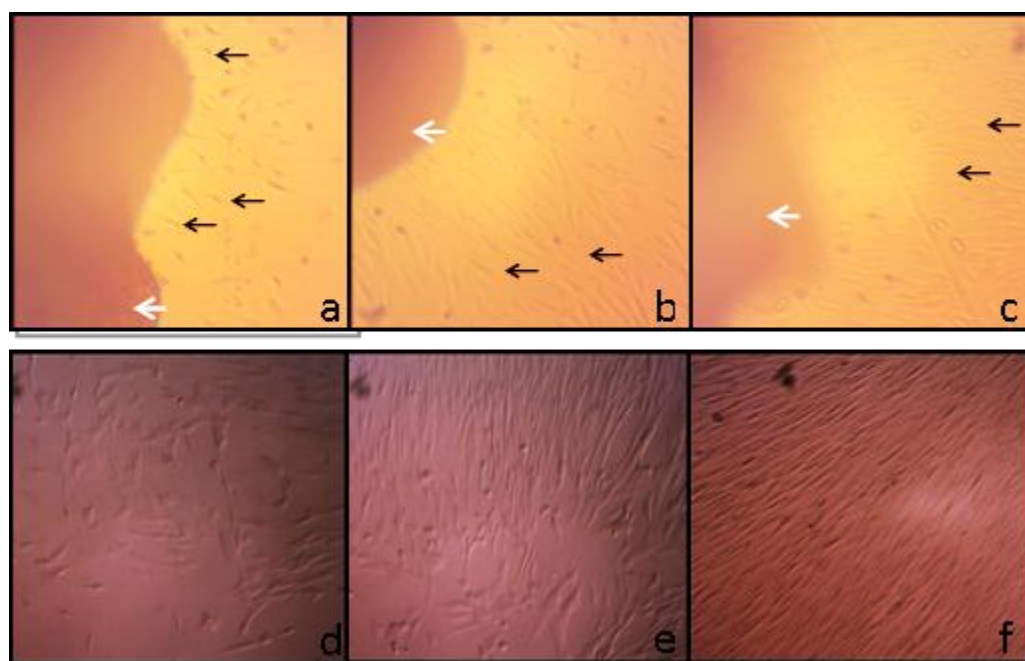


Figura 5 - *Explants* (setas brancas) e o início da migração dos fibroblastos pulpare humanos (setas pretas) (a, b, c) e FPHs em baixa confluência (d, e) e em confluência 70%(f), forma bem alongada (aumento de 40 X).

4.4.4 Contagem Celular

Antes da realização dos experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade foi determinado o número de células existentes nos frascos de cultivo. A finalidade dessa contagem é conhecer o número de células para uma divisão igualitária de células por grupo. O número de células semeadas em cada poço, tanto para as 3T3/NIH quanto para os fibroblastos pulpare humanos (FPH), foi de 2×10^4 células para a citotoxicidade e 4×10^4 células para a genotoxicidade.

Para a determinação do número (contagem celular), as células foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas utilizando-se 3ml de solução de tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen–Lote: 794994) para as garrafas de cultivo de 75cm^2 , por 5 minutos. Para neutralizar a ação da tripsina foram adicionados no mínimo a mesma quantidade de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% antibiótico. Os fibroblastos provenientes

da cultura primária não foram centrifugados por se tratar de células maiores e mais frágeis quando comparadas com a linhagem imortalizada de fibroblastos de camundongos 3T3/NIH.

Após, o conteúdo total da garrafa utilizada no experimento foi removido e colocado em um Falcon de 15ml. O volume de células foi homogeneizado no sobrenadante com uma pipeta volumétrica de 10ml. De cada suspensão celular, 20µl foram dispensados em um tubo de criogenia.

Fora do fluxo laminar, uma gota dessa mistura foi colocada em um hematocítmetro (Câmara de Neubauer Espelhada Melhorada/ Labor Optik) e levado ao microscópio de fase invertido (modelo AAKER) para a realização da contagem. As células com aspecto brilhante e formato arredondado foram consideradas viáveis, enquanto as células escurecidas com formato distorcido foram consideradas mortas, não sendo contabilizadas na contagem dos 4 quadrantes das extremidades. O cálculo foi feito com base na fórmula onde o número total de células viáveis contadas nos 4 quadrantes externos foi multiplicado por 10^4 (fator de correção do hematocítmetro). Esse valor foi dividido pelo número de quadrados contados (nesse caso 4) e multiplicado pelo fator de diluição que é a quantia do meio de cultura adicionado. A partir dessa fórmula obtivemos a quantidade aproximada de células presentes em cada garrafa.

O número total de células (NT) presentes no frasco foi obtido através da equação abaixo, onde FD é o fator de diluição.

$$\text{NTcélis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total céls viáveis} \times \text{FD} \times 10^4}{4 \text{ (n}^\circ \text{ quadrados contados)}}$$

De acordo com a quantidade de células viáveis existentes, calculou-se o número de células necessárias para o plaqueamento celular para a realização dos ensaios de

citotoxicidade e genotoxicidade. Para a citotoxicidade foi necessário 2×10^4 céls/poço em 200µl e para a genotoxicidade, 4×10^4 céls/poço em 400µl. Uma nova equação matemática foi feita sob uma regra de três.

$\frac{\text{N}^\circ \text{ T células}}{\text{N}^\circ \text{poços(96ou12)} \times \text{N}^\circ \text{ céls}(2 \times 10^4 \text{ ou } 4 \times 10^4)} = \frac{19200 \mu\text{l ou } 4800 \mu\text{l}}{\text{x (suspensão cel.)}}$

A suspensão de células foi diluída de acordo com o número de poços usados. Na citotoxicidade foram usadas placas de cultivo celular (ELISA/ Techno Plastic Products) de 96 poços (96 x 200 µl). Para a genotoxicidade foi usada a placa de cultivo celular de 24 poços (Techno Plastic Products), entretanto foram usados apenas 12 poços por experimento (12 x 400µl). Através desta regra de três obteve-se a quantidade da suspensão celular que seria necessário diluir em meio de cultivo para se obter o volume necessário para cada experimento.

4.5 Ensaio de viabilidade celular / citotoxicidade

As condições de tratamento incluindo cultura e tempo de exposições foram baseadas nas especificações de International Standards Organization (1997).

Os monômeros testados foram usados em concentrações de 10mM, 1mM, 0,1mM, 0,01mM e 0,001mM, sempre diluídos no mesmo meio usado na cultura celular. Foram feitas diluições dos monômeros a partir de uma solução padrão de 100mM, onde foi acrescentado 0,5% de dimetil sulfóxido (DMSO).

Foi usada a mesma densidade de células, tanto para as 3T3/NIH, quanto para os FPHs, e todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar.

A suspensão das células foi plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em placas de cultivo celular (ELISA/ Techno Plastic Products) de 96 poços. Cada poço recebeu 200µl de DMEM suplementado com 10% SFB e 1%

antibiótico, onde estava o número de células descrito. As placas foram então incubadas à 37°C a 5% CO₂ (Thermo Electron Corporation) por 48 horas (FPH) e 24 horas (3T3/NIH) para promover a adesão celular ao fundo dos poços. Por causa da baixa proliferação das células primárias (tempo de ciclo celular: 26-36 h) estas necessitam ficar mais tempo que as de linhagem permanente (tempo do ciclo celular: 18-20 h) (FRESHNEY, 2000).

Passados os tempos detalhados acima, foram retirados com pipeta multicanal os 200µl do meio de cultura de cada poço e adicionados 200µl/poço das diferentes concentrações seriadas (de 10mM a 0,001mM) de cada monômero (FERNANDEZ et al., 2010). As substâncias foram diluídas em DMEM completo e ficaram em contato com as células pelo período de 24 horas. Nos poços controles, foram adicionados 200 µl de DMEM com a mesma quantidade de células e seu meio de cultura, trocado após as primeiras 24 horas (3T3/NIH) ou 48 horas (FPH). Poços com DMEM sem a adição de monômeros e sem adição de células foram usados como controles brancos.

Após 24 horas foi feita a remoção dos monômeros testes e adicionados 20µl de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo) (Sigma/Aldrich) diluídos em 180 µl de DMEM em cada poço (5 mg/ml MTT). As placas foram então incubadas em ambiente sem luminosidade por 4 horas à 37°C em atmosfera com 5% CO₂ (Thermo Electron Corporation). Após este período, a solução contendo MTT diluído em DMEM foi aspirada e solubilizada com 200µl de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) que foram adicionados a cada poço.

As placas foram levadas a uma mesa agitadora (Biomixer/ TS-2000A UDRL Shaker) a uma velocidade de 150 rpm por 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazan produzidos pela redução do MTT pela desidrogenasesuccínica da respiração celular. Subsequentemente, a absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (Termoplate/TP-Reader) em um comprimento de onda de 540nm.

4.6 Ensaio de genotoxicidade

O ensaio utilizado para a verificação da genotoxicidade dos monômeros foi o teste de micronúcleos (MN) com a coloração pela técnica de Feulgen. Em 1912, Robert Feulgen introduz a técnica de coloração do DNA cromossômico com especificidade técnica denominada reação de Feulgen que permitiu a realização de inúmeros estudos de quantificação de DNA. A coloração com a Técnica de Feulgen consiste na pigmentação de todos os elementos celulares que contenham DNA, o qual, após hidrólise ácida moderada, quando tratado pelo reagente de Schiff, dá lugar à formação de um produto que cora num tom de vermelho arroxeado (KASTEN 2003).

Os ensaios de genotoxicidade foram executados sempre em capela de fluxo laminar e foram utilizadas somente as células 3T3/NIH.

As células foram semeadas em placas de 24 poços (Techno Plastic Products) sobre lamínulas de vidro circulares de 13mm (G13C Glasscyto), nas quais houve adesão. Procedeu-se à contagem celular e em cada poço foram adicionadas 4×10^4 células em 400µl de meio de cultura (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 1% de antibiótico.

As placas contendo as lamínulas e as células ficaram em repouso em atmosfera de 5% de CO₂, à 37°C (Thermo Electron Corporation), por 24 horas. Depois deste período o meio foi retirado dos poços com cuidado de não tocar nas lamínulas e, após adicionados 400µl/poço de cada monômero na concentração de 0,1 mM que foi a concentração intermediária pré-estabelecida nos ensaios de citotoxicidade onde havia viabilidade celular suficiente para o teste de MN. Novamente as placas foram colocadas em estufa com 5% CO₂, à 37°C e, após 24 horas de contato com os monômeros-teste as lamínulas contendo as células foram lavadas com 1ml/poço de PBS por 10 segundos, O PBS foi removido e as células foram fixadas e coradas com protocolo adaptado de Fernandez et al., (2010).

Fora da capela de fluxo laminar as lamínolas com as células foram fixadas dentro dos próprios poços, mediante adição de 1ml/poço de solução contendo 3 partes de metanol (Vetec) para 1 parte de ácido acético (Synth). As placas foram então levadas ao freezer -20°C por 30 minutos e, passado este período, o metanol/ácido acético foi removido e adicionado 1ml/poço de ácido clorídrico 1N (Synth) à temperatura ambiente por 1 minuto. Removido o ácido clorídrico foi adicionado novamente 1ml/poço de ácido clorídrico 1N pré-aquecido à temperatura de 63°C e mantido em estufa (FANEM) de 60°C por 10 minutos. Após este período a placa foi resfriada à temperatura ambiente por 10 minutos e removido o ácido clorídrico, adicionado novamente o mesmo (HCl, 1N), por mais 5 minutos. Após, foi removido novamente e adicionado 1ml/poço de água destilada por 10 minutos (2 passagens de 5 minutos, cada). A secagem das lamínulas foi à temperatura ambiente e dentro da placa.

Foram adicionados a cada poço 1ml da solução de Schiff por duas horas e trinta minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz e, logo após, o reagente removido e as lamínulas cobertas por água tamponada por 4 minutos, ao abrigo da luz. Passado este tempo procedeu-se lavagem com água destilada e as lamínulas foram removidas do interior dos poços, identificadas secas e armazenadas. Vinte e quatro horas após, as lamínulas foram imersas no corante Fast Green (Sigma-Aldrich) por 10 segundos e depois lavadas 3 vezes com álcool metílico 96° (Vetec) por 3 segundos cada imersão e deixadas para secar por 24 horas. Posteriormente as lamínulas foram fixadas às lâminas histológicas identificadas por códigos aleatórios para que, durante a leitura houvesse o cegamento dos examinadores.

Os micronúcleos foram visualizados em microscópio óptico comum (Olympus) com objetiva de 40x e oculares de 10x em lâminas identificadas e a contagem feita por três examinadores cegos. A determinação da proporção de micronúcleos foi mediante a contagem manual de células micronucleadas em 1000 células por lamínula, 2 lamínulas por monômero (Fig. 6).

Os critérios utilizados para caracterizar a formação dos micronúcleos foram os seguintes: (a) devem ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do

citoplasma da célula; (b) apresentarem coloração semelhante ao núcleo principal; (c) seu diâmetro deve ser menor que $1/3$ do diâmetro do núcleo principal; (d) devem estar no mesmo plano de foco do principal; (e) deve estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos (COUNTRYMAM, HEDDLE, 1976).

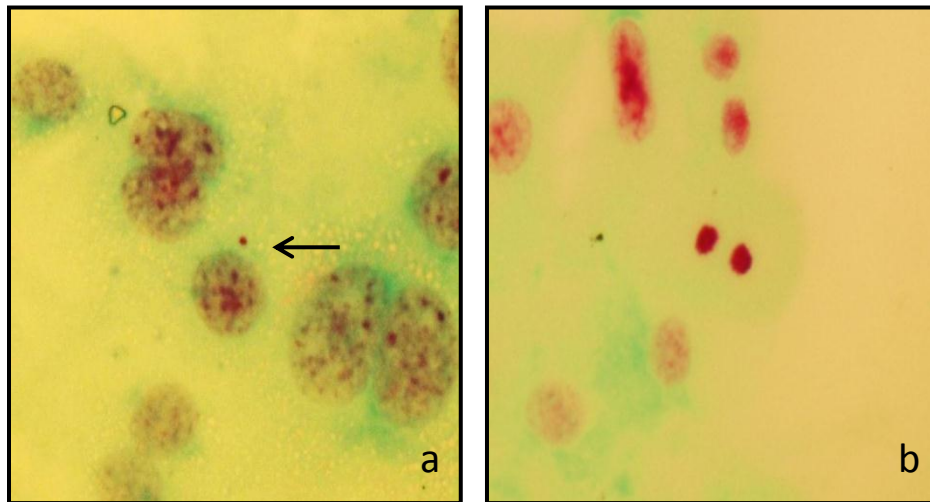


Figura 6 – Fotomicrografia de célula micronucleada, MN (seta) de forma arredondada (a); um dos critérios de exclusão: cromatina condensada em duas células-filhas, pós-mitose (b).

5 Resultados

Os resultados do presente estudo, apoiam a rejeição de ambas as hipóteses nulas testadas.

5.1 Zimografia

Uma banda foi detectada nos géis de poliacrilamida no ensaio de zimografia, correspondente à massa molecular de aproximadamente 66 KDa ou a forma ativa da MMP-2 (Fig. 8) de acordo com o padrão de peso molecular usado. (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen). Estas enzimas foram caracterizadas como metaloproteinases da matriz, pois a expressão foi inibida pelo EDTA, enquanto o NEM (um inibidor de proteases serinas) não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática (Fig. 7) após a incubação por 24 horas em solução contendo 5mM CaCl_2 em tampão 50mM Tris-HCl (Tris- CaCl_2).

Para quantificar a inibição relativa pelos diferentes tipos e concentrações dos monômeros, as bandas foram digitalizadas e as transmitâncias foram analisadas com o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). O percentual de inibição foi relacionado com o controle de cada concentração, em cada material testado. A intensidade de transmitância das bandas foram quantificadas em pixels, na escala de cinza, com o mesmo programa. Tal programa usado permite igualar o *background*, e deste modo, somente as bandas são analisadas (Fig. 9). Os dados obtidos foram transformados em valores numéricos e cada valor encontrado foi dividido pelo valor do respectivo controle, obtendo-se assim, percentuais. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

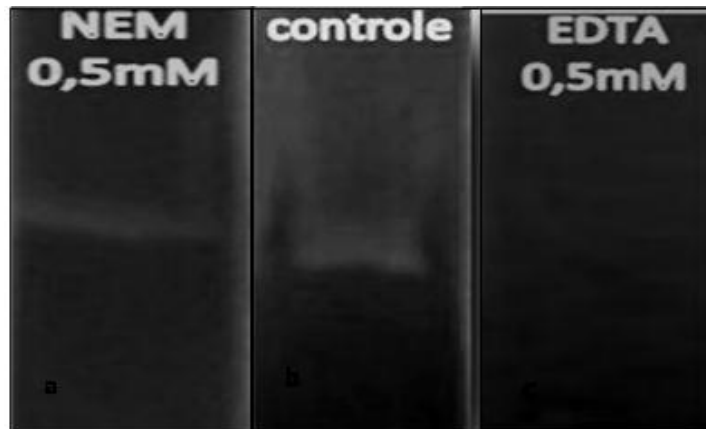


Figura 7 – Controle mostrando que não houve inibição quando incubados apenas em Tris- CaCl_2 (b); caracterização das enzimas como MMPs pois suas expressões foram inibidas por EDTA (c) e NEM (a) não teve nenhum efeito sobre a atividade da MMP. Gel de zimografia revelando a atividade da MMP-2(66KDa).

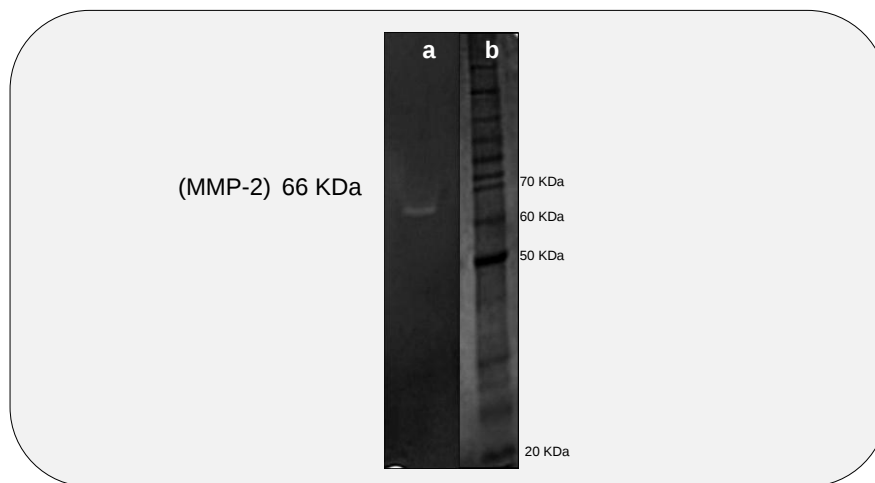


Figura 8 – Padrão de peso molecular (b) (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen), bandas correspondentes à pesos moleculares expressos em KDa, a partir de 20KDa. Banda em 66KDa, correspondendo à forma ativa da MMP-2 (a).

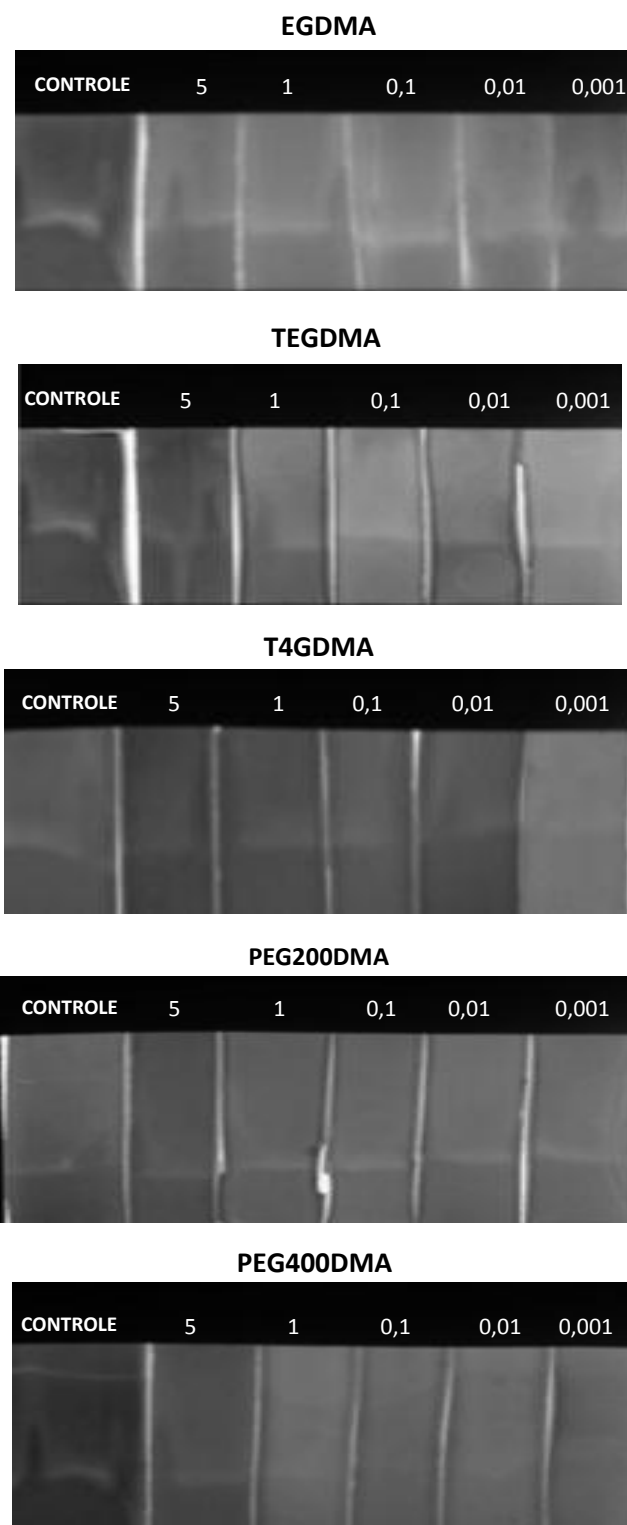


Figura 9 – Géis de zimografia – as imagens mostram o potencial de inibição da expressão da MMP-2 pelos monômeros metacrilatos condicionados em tampão Tris- CaCl_2 .

5.1.1 Percentual de inibição de cada monômero, em relação ao controle:

Tabela 3 – Descrição numérica do percentual de inibição de cada concentração dos monômeros metacrilatos.*

	EGDMA	TEGDMA	T4DMA	PEG200	PEG400
5mM	50,05	65,68	62,45	63,15	58,18
1mM	69,77	58,48	69,68	0	58,18
0,1mM	67,68	46,40	0	0	58,18
0,01mM	51,87	56,42	60,52	0	58,18
0,001mM	55,12	50,49	60,52	0	58,18

*O número 0 indica todo o potencial enzimático da MMP-2, e os demais algarismos representam a inibição da enzima em relação ao seu respectivo controle.

5.1.2 Análise descritiva das inibições de cada experimento, em relação ao controle:

EGDMA todas as concentrações inibiram parcialmente em torno de 50%, exceto 1mM, que foi inibitória em 70% e 0,1mM que inibiu 68%.

TEGDMA todas as concentrações tiveram um pequeno potencial inibitório, de 58% a 46%, mas 5mM foi a de maior inibição, em torno de 65% .

T4GDMA teve potencial inibitório em torno de 60% nas concentrações de 5mM, 0,01mM e 0,001mM. A concentração de 1mM inibiu em torno de 70% e em 0,1mM não houve inibição.

PEG200DMA somente foi inibitório na concentração de 5mM, em torno de 63%;

PEG400DMA teve intermediária inibição em todas as concentrações, em torno de 58 %;

5.2 Citotoxicidade

Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos independentemente 4 vezes para cada tipo celular (FPHs e 3T3/NIH). Em todos os ensaios os valores foram expressos em porcentagem nos quais o valor máximo de 100% foi o controle (sem tratamento) e plotados em concentração mM em uma escala decrescente fracionada.

Os dados são apresentados como a porcentagem média das absorbâncias para cada sistema de teste e o valor da média de cada triplicata foi dividido pelo valor da absorbância do controle do respectivo teste, obtendo-se assim, as porcentagens de cada concentração de cada monômero dentro dos independentes experimentos.

Os cálculos foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi verificada através da análise por ANOVA e Tukey ($P \leq 0,05$).

Em todos os grupos de ambas as células a concentração de 10mM induziu a 100% de morte celular (Gráfico 1).

Nos FPHs, estatisticamente em relação ao grupo controle (não tratado), os monômeros foram mais citotóxicos nos grupos EGDMA (concentração 10mM e 0,1mM), TEGDMA (concentração 10mM e 1mM) e grupo T4GDMA (concentração de 10mM). Nos grupos PEG200DMA e PEG400DMA todas as concentrações tiveram diferença estatística em relação ao controle.

Nas células 3T3/NIH, todas as concentrações do monômero EGDMA foram semelhantes estatisticamente ao grupo controle, exceto a concentração de 10mM. No grupo TEGDMA houve diferença estatística em todas as concentrações, em relação ao controle. O grupo T4GDMA foi menos citotóxico na concentração 0,01mM e todas as outras concentrações foram diferentes estatisticamente do controle. PEG200DMA teve maior citotoxicidade nas concentrações de 10mM, 1mM e 0,01mM e PEG400DMA teve diferença estatística entre os grupos controle e as todas as concentrações, exceto na concentração de 0,1mM.

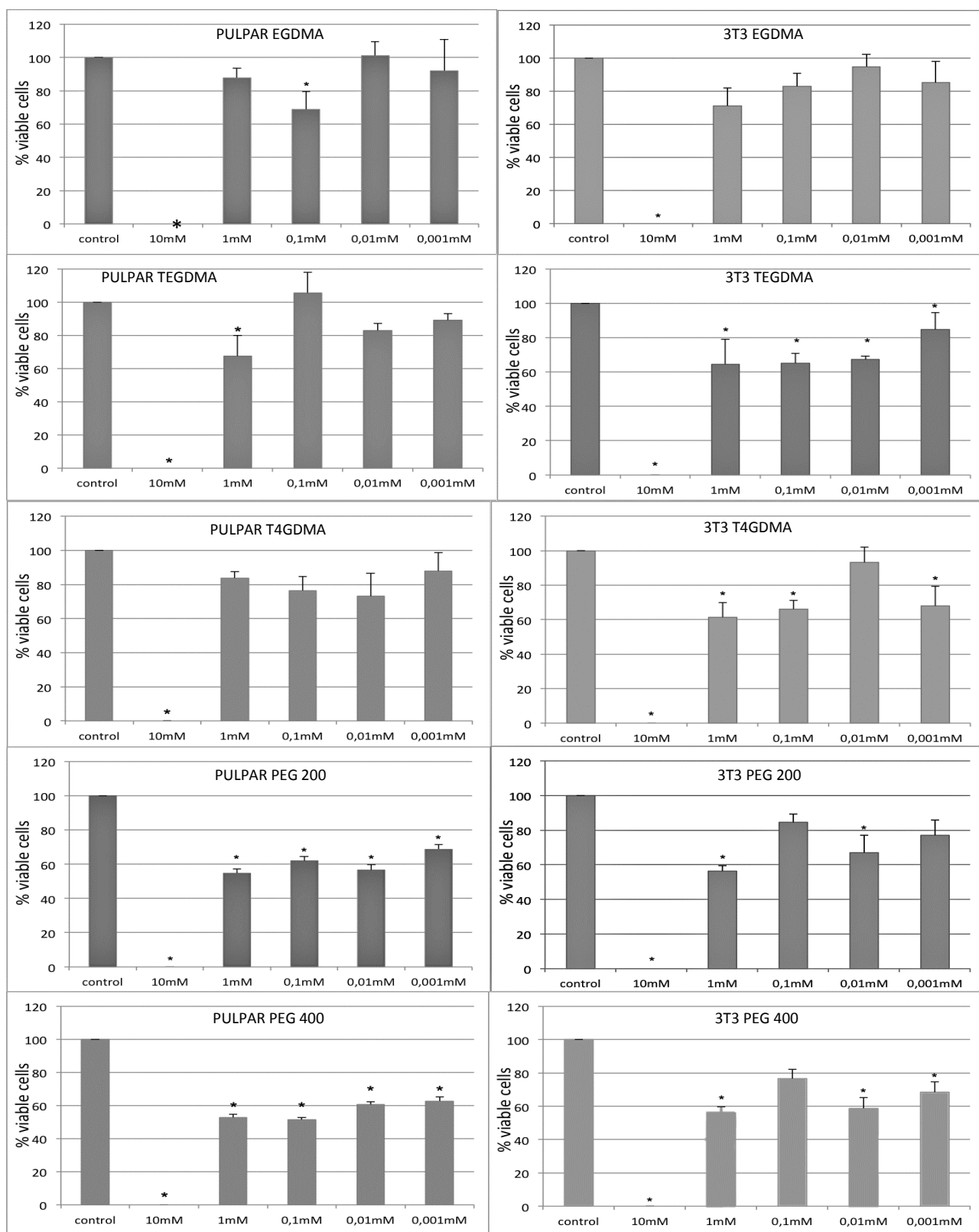


Gráfico 1 - Sobrevivência celular de FPH (a) e 3T3 (b) expostos por 24 hs à EGDMA (1), TEGDMA (2), T4GDMA (3), PEG 200 DMA (4) e PEG 400 DMA (5) nas diferentes concentrações. Dados normalizados de acordo com a densidade das leituras (absorbância de 570nm) de quatro culturas de cada tipo celular, feitas em triplicatas. As barras representam as medianas, e * representa diferença estatística com relação ao controle (não tratados).

5.3 Genotoxicidade

A estatística usada foi ANOVA, seguida de Tukey para comparação de múltiplos grupos. Foram contadas 2000 células por 3 avaliadores cegos, em dois experimentos diferentes, e feito uma média destas leituras (Tab. 4).

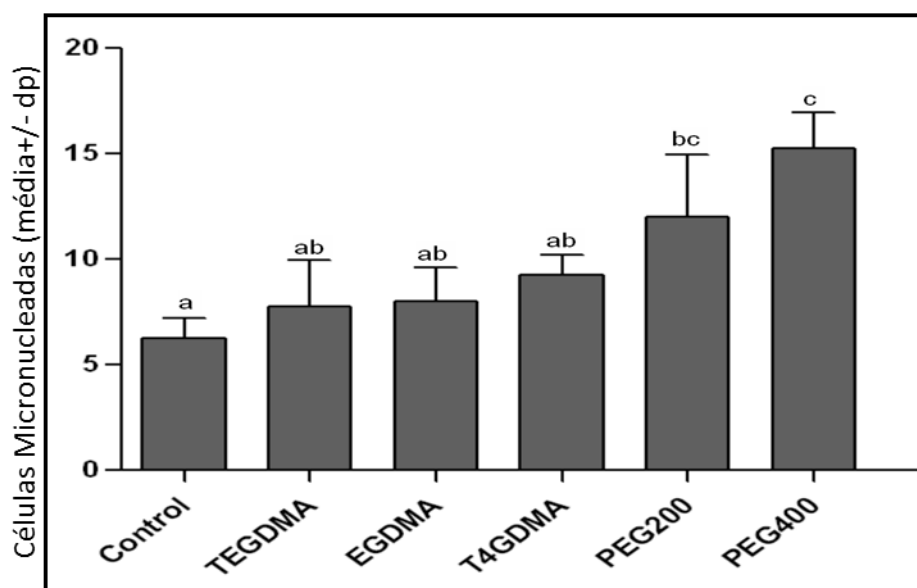


Gráfico 2 - Comparação da quantidade de células 3T3/NIH micronucleadas do grupo controle (não tratado) com a quantidade de células MN após a exposição de 24h de cada monômero (0,1mM).

A frequência de células 3T3/NIH micronucleadas foi numericamente mais alta em todos os monômeros testados em comparação ao controle/não tratado (Tabela 4).

Houve diferença estatística entre os grupos que possuem cadeias mais longas de óxido de etileno, PEG200DMA e PEG400DMA, quando comparados com o controle. Já os monômeros TEGDMA, EGDMA e T4GDMA não tiveram diferença estatisticamente em relação ao controle, mas foram estatisticamente diferentes do monômero de maior peso molecular, o PEG400DMA, e semelhantes ao PEG200DMA.

Os monômeros PEG200DMA e o PEG400DMA não tiveram diferenças estatísticas entre si (Gráfico 2).

Tabela 4 - Frequência de células MN após 24 horas de exposição aos monômeros. (n=2000)

Grupos	Média ± S.D.
Controle	6.25 ^a ± 0.9
TEGDMA	7.75 ^{ab} ± 2.2
EGDMA	8 ^{ab} ± 1.6
T4GDMA	9.25 ^{ab} ± 0.9
PEG200DMA	12 ^{bc} ± 2.9
PEG400DMA	15.25 ^c ± 1.7

Diferentes letras indicam diferença estatística entre os resultados (p<0.05).

6 Discussão

A matriz dentinária contém metaloproteinases de matriz (MMP), as quais pertencem a um grupo de enzimas zinco e cálcio-dependentes que regulam o metabolismo fisiológico e patológico dos tecidos à base de colágeno (TJÄDERHANE et al., 1998) e apresentam potenciais e relevantes implicações na adesão dentinária (PASHLEY et al., 2004). Evidências de atividades colagenolíticas e gelatinolíticas em dentina parcialmente desmineralizada tratada com adesivos convencionais (MAZZONI et al., 2007) destacam o potencial risco que estas endoproteases exercem no rompimento das fibrilas de colágeno incompletamente infiltradas dentro da camada híbrida.

A ativação ácida da MMPs, poderia ser um mecanismo comum na degradação da matriz de colágeno nos tecidos dentários mineralizados. Os autores reforçam a ligação das MMPs derivadas do próprio hospedeiro na progressão da cárie dental humana. Além disto, a ativação das formas latentes das enzimas de pH 4.5, seguido da neutralização prova que a atividade das MMPs são aumentadas em condições ácidas, como nas presentes nas lesões cariosas. Os períodos entre pH abaixo de 5.5 e períodos com pH neutro, devido ao tamponamento feito pela ação salivar, proporciona a sequência na qual as fibras colágenas da matriz orgânica dentinária são primeiramente expostas e então degradadas pelas MMPs (TJÄDERHANE et al., 1998).

Como a MMP-2 e MMP-9 são as principais enzimas proteolíticas existentes na dentina (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; MAZZONI et al., 2007), optou-se em usar o ensaio de zimografia que é uma técnica muito sensível para gelatinases, na qual a partir de 10 pg de MMP-2 ou MMP-9 as atividades proteolíticas podem ser detectadas (DE MUNCK et al., 2010).

Gelatinases (MMP-2 e MMP-9) possuem similaridade estrutural exclusiva e única, a qual faz delas diferentes de outras MMPs. Elas possuem módulos de fibronectina tipo II no seu domínio catalítico, os quais formam o domínio vinculado ao

colágeno que interagem especificamente com gelatina e que é fundamental para a clivagem dos substratos (NAGASE, VISSE e MURPHY, 2006).

Em nosso trabalho foi estudada a atividade gelatinolítica da MMP-2, a qual é uma das MMP-s existente em maior quantidade na dentina humana. (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000). Entretanto, Sulkala et al. (2007) mostraram que a MMP-8 (colagenase-2) está intrínseca nos compartimentos mineralizadas ou desmineralizados da dentina humana. A MMP-8 também é expressa por odontoblastos, tecidos pulpaes de dentes humanos totalmente desenvolvidos e fibrilas colágenas, pois tem como substrato preferencial o colágeno tipo I, o qual é o principal tipo de colágeno da matriz orgânica dentinária (LINDE e GOLDBERG, 1993).

Além disto, a MMP-2 foi identificada em altas concentrações na matriz dentinária (MAZZONI et al., 2007). Breschi et al., (2010b) mostram que embora se pense que as análises quantitativas das diferentes MMPs dentinárias estejam completas (MARTIN DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2007), os dados do seu trabalho indicam que a MMP-2 pode ser a MMP de maior prevalência na dentina humana, em concordância com a MMP avaliada na presente investigação.

Sulkala et al. (2007) não observaram a atividade colagenolítica da MMP-8 em ensaios utilizando dentina pulverizada e autoclavada, mas houve atividade gelatinolítica da MMP-2 na mesma condição. Este achado sugere que ao contrário da MMP-8, as gelatinases dentinárias são muito mais resistentes a procedimentos de tratamentos externos, assim como sugerido previamente por Martin de Las Heras et al. (2000).

As MMPs são enzimas relativamente grandes, com peso molecular no intervalo de 60 a 90 KDa. Na matriz dentinária quase todas as MMPs estão imbricadas nas fibrilas de colágeno apresentando ligações fortes que necessitam de medidas extremas para extraí-las. Em nosso trabalho foram usados guanidina-HCl e EDTA em repetidas extrações, e segundo Pashley et al. (2011), quanto maior o número de extrações, maior quantidade de MMPs podem ser alcançadas.

Estudos prévios tem identificado MMP-2 na dentina humana, seja em frações de proteínas desmineralizadas ou mineralizadas, e demonstraram que houve atividade gelatinolítica em dentina desmineralizada após a extração por EDTA, (MARTIN DE LAS HERAS et al., 2000; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2007; SANTOS et al., 2009). Estes relatos sugerem que o poder de inibição da MMP pelo EDTA é reversível, e sua utilização no processo de extração facilitaria a detecção da atividade das gelatinases por zimografia.

Devido à específica necessidade de íons cálcio e zinco para o completo desempenho das suas atividades proteolíticas, as enzimas avaliadas quando incubadas em tampão/5mM EDTA, demonstraram ser verdadeiramente MMPs com atividade gelatinolítica em nossos ensaios de zimografia, excluindo outras MMPS, tais como estromelisinases e colagenases, as quais possuem uma baixa especificidade por gelatina (VISSE e NAGASE, 2003; MAZZONI et al., 2007).

As propriedades de ligação das gelatinases ao colágeno nativo ou desnaturado, estão principalmente relacionadas com as três repetições do domínio das fibronectinas tipo II, inseridas no domínio catalítico destas MMPS (VISSE e NAGASE 2003). Os resultados sugerem que nossa técnica de extração rompeu a ligação colágeno-gelatinase e liberou a atividade de gelatinases solúveis, antes vinculadas à dentina humana, as quais foram identificadas pelo ensaio de zimografia.

Muitos trabalhos desenvolvidos suportam o conceito de que instabilidade das camadas híbridas (CH) está relacionada à atividade das MMPs endógenas dentinárias (MARTIN-DE LAS HERAS et al., 2000; PASHLEY et al., 2004; NISHITANI et al., 2006; SULKALA et al., 2007; MAZZONI et al., 2007; BRESCHI et al., 2010b; PASHLEY et al., 2011), e que a inibição destas enzimas provenientes do próprio hospedeiro é de grande importância para a longevidade das restaurações adesivas.

Desde que os efeitos adversos das MMPs na dentina madura humana foram identificados (PASHLEY et al., 2004) muitos estudos estão sendo realizados para identificar inibidores não-tóxicos destas enzimas, como potenciais agentes que possam ser incorporados nos materiais restauradores.

A CHX foi identificada como tendo um forte poder inibitório das MMPs em trabalhos *in vivo* (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007b) e *in vitro* (GENDRON et al., 1999; CARRILHO et al., 2007a; BRESCHI et al., 2010b). Entretanto, este material não pode ser copolimerizado com outros monômeros metacrilatos, sendo liberada e a continuidade da sua ação em estudos à longo prazo ainda é desconhecida. O maior estudo relacionado à preservação da CH pela CHX, que temos conhecimento, relata 2 anos de longevidade (BRESCHI et al., 2010b). Estes últimos autores usaram 0,2-2% de CHX, incubando este inibidor com um adesivo comercial e também avaliando a estabilidade da CH após 2 anos. Os resultados foram positivos, mesmo nas menores concentrações, porém o estudo mostra evidências de que as MMPs endógenas ligadas à dentina humana, principalmente a MMP-2, são ativadas pela ação do adesivo (AdperScotchbond 1XT), e esta ação é inibida pela CHX.

Alguns dados reportados na literatura confirmam que o aumento da atividade da degradação da matriz dentinária é feita pelos adesivos (NISHITANI et al., 2006; BRESCHI et al., 2010b; MOON et al., 2010; PASHLEY et al., 2011), e pode ser relacionado com a ativação da MMP-2, e ainda salientam o envolvimento da MMP-2 na degradação da CH e perda da resistência adesiva (HEBLING et al., 2005; CARRILHO et al., 2007a; CARRILHO et al., 2007b). Estas afirmações demonstram a necessidade de mais pesquisas relacionadas com outros materiais que possam ficar em íntimo contato com as fibras colágenas e que não participem efetivamente da ativação destas enzimas endógenas, principalmente da MMP-2.

Pode ser possível inativar as MMPs pelo tratamento ácido com o EDTA, pela quelatação de cátions divalentes, porém enquanto este material a 0,1M (pH 7,4) demora alguns minutos pra condicionar a dentina, o ácido fosfórico a 37%, leva apenas quinze

segundos, fato que torna a utilização do EDTA, por ser um ácido fraco, inviável clinicamente (OSÓRIO et al, 2005; SAURO et al., 2009).

Outra abordagem para inativar a MMPs endógenas da dentina seria promover ligações cruzadas com suas próprias cadeias peptídicas logo após o condicionamento ácido. Porém causaria a perda da mobilidade molecular da enzima, a qual é essencial para a atividade enzimática. O glutaraldeído é uma substância usada como agente de ligação cruzada, no entanto, seus resíduos são liberados nos tecidos tratados e tem se mostrado citotóxico (HUANG et al., 1990 apud PASHLEY et al., 2011).

Carvalho et al., (2010) recentemente avaliaram o TEGDMA e foram mostradas evidências da inibição da MMP-2, através de um ensaio por zimografia, porém este estudo foi feito com MMPs extraídas a partir de *explants* de tecido gengival de camundongos. Isto ressalta a importância do nosso atual trabalho, quando comparamos novamente o potencial de inibição da MMP-2 deste monômero (TEGDMA) com os outros quatro monômeros (EGDMA, T4GDMA, PEG200DMA e PEG400DMA) em MMPs derivadas de dentina humana.

A maioria dos monômeros metacrilatos apresentou uma considerável, mas não total inibição da MMP-2 em todas as concentrações nos ensaios de zimografia. A exceção foi o PEG200DMA, o qual somente a concentração de 5mM inibiu a atividade gelatinolítica da referida MMP e esta foi em média 63%.

No presente estudo, o monômero TEGDMA teve pequeno potencial inibitório em menores concentrações, porém promoveu maior inibição na concentração de 5mM, o que mostra concordância com estudo anterior (CARVALHO et al., 2010), no qual foi demonstrado o potencial inibitório da MMP-2 pelo TEGDMA nas maiores concentrações. Estes autores avaliaram a inibição em concentrações, as quais foram expressas em porcentagens e não em molaridade. Apesar desta diferença na apresentação das concentrações é possível encontrar concordância no potencial inibitório da MMP-2 deste monômero nas maiores concentrações.

No estudo de Henn et al. (2011), foi analisado o monômero Metacrilato de Zinco, um novo grupo de monômeros metacrilatos. Este material apresentou potencial inibitório para a gelatinase, em todas as concentrações estudadas. Porém tais concentrações foram consideravelmente maiores do que as do presente estudo, ficando entre 0,5mM e 16mM.

Foi feita a avaliação da citotoxicidade dos monômeros testados no presente estudo em concentrações seriadas (10mM, 1mM, 0,1mM, 0,01mM e 0,001mM). A concentração de 10mM promoveu 100% de morte celular, nas duas linhagens celulares estudadas, em todos os materiais testados. Porém esta concentração não é tão alta quando comparada com seu uso clínico nas formulações dos adesivos. Testes *in vivo* seriam necessários para avaliar a biocompatibilidade dos mesmos monômeros em diferentes concentrações, para o uso em humanos.

O potencial inibitório dos monômeros metacrilatos não é perfeitamente entendido, mas estes monômeros possuem em suas estruturas grupamentos éteres com alta flexibilidade. O que é bem conhecido, é o fato de os grupamentos funcionais éteres de coroa formarem complexos com cátions bivalentes (INOKUMA et al., 2005).

Carvalho et al., 2010 consideram que a estrutura do TEGDMA por possuir cadeia com alta flexibilidade, poderia formar éteres de coroa entre seus grupamentos éter e o Zn^{2+} presentes no domínio catalítico da MMP ou ainda que poderia ocorrer um complexo entre o cátion bivalente e o grupamento carboxila do monômero, através de interações tipo ácido-base de Lewis.

Estes mesmos autores supõem que podem ocorrer discrepâncias entre os achados *in vitro* e os observados *in vivo*, pois quando as fibrilas de colágeno estão desprotegidas, estas podem ser mais susceptíveis aos ataques proteolíticos devido à ação de ácidos provenientes do próprio condicionamento dentinário ou dos fluidos orais. Além disso, estes monômeros podem sofrer interações com outros componentes dentro de um sistema adesivo (CARVALHO et al., 2010).

Todos os monômeros avaliados possuem longas cadeias de óxido de etileno, o que propicia aos materiais uma grande flexibilidade e melhora a mobilidade do sistema. Isto poderia explicar o porquê destes materiais apresentarem um potencial inibitório da MMP-2, mesmo em pequenas proporções. Hipoteticamente, poderiam formar éteres de coroa com o cátion bivalente presente (Zn^{2+}) no sítio ativo do domínio catalítico e assim neutralizar a ação gelatinolítica da enzima (MATSUYAMA et al., 1991; INOKUMA et al., 2005; CARVALHO et al., 2010).

Além disso, a presença dos grupamentos polimerizáveis ($-\text{C}=\text{C}-$), possibilita a formação de polímeros de cadeias cruzadas, os quais são menos susceptíveis à hidrólise, pois a água pode inibir a polimerização dos adesivos dentinários, afetando especialmente os componentes hidrofílicos dos adesivos. Estes dimetacrilatos surfactantes são ambifílicos, pois possuem componentes orgânicos contendo grupos hidrofóbicos (2 cadeias de metacrilatos) e hidrofílicos (longa e estendida cadeia de óxido de etileno). Esta característica bipolar promove uma melhora na solubilidade, facilitando a penetração deste componente hidrofóbico na dentina desmineralizada, reduzindo as separações de fase e aumentando a resistência adesiva da CH (OGLIARI et al., 2008).

Guo et al., (2007) comprovaram que a adição do PEGDMA pode melhorar a infiltração homogênea dos adesivos nos substratos de dentina molhada desmineralizada, diminuindo a possibilidade de falhas na interface da CH. Esta afirmação confirma a importância da pesquisa desta classe de novos monômeros metacrilatos com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e biológicas da CH.

Novos monômeros metacrilatos com relativamente alto peso molecular são propostos para a diminuição da contração de polimerização, bem como pela possibilidade de formação de um polímero de cadeias cruzadas, mais flexível e mais resistente à degradação enzimática. Monômeros com capacidade de formação de cadeias cruzadas e não apenas ligações espaciais lineares, como o que ocorre com o HEMA, são cada vez mais alvo de estudos (OGLIARI et al., 2008; ZANCHI et al., 2011).

Anusavice et al. (2005) demonstram que quanto mais longa a cadeia do polímero, maior é a quantidade de tramas que podem formar-se entre as cadeias. Portanto quanto mais longa a cadeia, mais difícil distorcer o material polimérico, e assim, as propriedades como rigidez, resistência e temperatura de fusão aumentam com o aumento do comprimento da cadeia. Biologicamente esta polimerização raramente ocorre por completo e que as moléculas de monômeros residuais podem ser lixiviadas dos materiais poliméricos.

Os materiais adesivos contém polímeros metacrilatos, os quais devido a mecanismos de abrasão e ação enzimática podem ter seus monômeros liberados na cavidade oral e também na polpa. Como a polimerização de um monômero é catalisada pela ação de um co-monômero as ações combinadas podem ser consideradas, e segundo Wisniewska-Jarosinska, et al. (2010) podem ser até diminuídas quando um monômero e um co-monômero agem em conjunto. Os monômeros testados neste estudo foram avaliados isoladamente e podem ter ações diferentes em outros estudos, caso testados em conjunto com outros monômeros comumente usados na composição de sistemas adesivos.

Num estudo prévio de Geurtsen et al. (1998), em algumas substâncias testadas foi encontrada grande variação de valores de ED₅₀ (dose efetiva, na qual há 50% de viabilidade celular) nas diferentes linhagens celulares. Neste estudo, não houve nenhuma linhagem identificada que pudesse ser consistentemente considerada mais ou menos sensível. No nosso trabalho, usamos a linhagem imortalizada 3T3/NIH e os FPH derivados de cultura primária, e também não foi encontrado uma linhagem mais sensível que outra, provavelmente por diferenças no metabolismo celular, estabilidade da membrana ou relacionamento estrutura-toxicidade destes componentes. As células permanentes são cultivadas por anos, e mostram morfologia e fisiologia homogêneas. Em contraste, culturas de células primárias revelam uma extensão de vida limitada e são heterogêneas, porém simulam melhor uma situação *in vivo*. Assim, cada substância pode ter sua citotoxicidade testada por diferentes culturas celulares, imortalizadas ou

primárias (GEURTSEN 2000), o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, o qual usou dois tipos diferentes de células para comparação.

O ensaio por MTT é um dos indicadores colorimétricos de viabilidade celular de maior utilização por apresentar capacidade de avaliar a função celular mitocondrial de acordo com a redução enzimática do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (MOSMANN, 1983).

Testes *in vitro* já demonstraram existir sinergismo e antagonismo entre as diferentes substâncias que compõem um sistema adesivo, portanto a citotoxicidade de um monômero isolado *in vitro* pode não indicar o real comportamento do material quando em um sistema adesivo completo, nem mesmo quando interagindo com todo o sistema biológico de testes *in vivo* (RATANASATHIEN et al., 1995). Estes autores demonstram também que foi possível minimizar os erros usando três réplicas para cada concentração de cada monômero e cada ensaio foi repetido quatro vezes, o que vem em concordância com nossa metodologia.

O controle de cada experimento continha apenas o meio de cultura completo acrescido de células. Não foi feito um controle com DMSO, o qual foi usado para a diluição dos monômeros, pois alguns estudos já demonstraram não haver diferença do crescimento no controle quando tratado com DMSO em comparação com o controle não tratado (GEURTSEN et al., 1998).

Nosso estudo mostrou não existir diferença da sensibilidade entre as células de cultura primária (FPH) e as de origem imortalizada (3T3), visto que houve um padrão semelhante nas duas linhagens no que diz respeito ao aumento da citotoxicidade à medida que aumentavam as cadeias de óxido de etileno dos monômeros testados (GEURTSEN et al., 1998; SCHWEIKL et al., 2001; REICHL et al., 2006).

Quanto à toxicidade no TEGDMA, um dos monômeros mais citados na literatura, nossos achados com FPHs mostraram diferença estatística em relação ao controle nas duas concentrações mais altas (10mM e 1mM) e nas 3T3 houve diferença estatística em todas as concentrações, o que denota concordância da literatura nos diferentes

parâmetros deste monômero e em diferentes tipos celulares (DEMIRCI et al., 2008). Nossas concentrações foram formuladas a partir de diluições seriadas, não avaliadas em concentrações intermediárias, nas quais seria possível comparar a concentração ED₅₀ (50% de redução da proliferação celular) de cada substância testada. Mas é possível comparar o monômero TEGDMA, que nos FPHs teve diminuição de sua viabilidade a partir da concentração de 1mM. E a concentração de 10mM provocou total inviabilidade celular, o que denota concordância com vários estudos prévios (SPAGNUOLO et al., 2004; REICHL et al., 2006; SCHWEIKL et al., 2007).

Geurtsen et al., (1998) desenvolveram um estudo com as células de linhagem permanente 3T3, as quais permaneceram no meio de cultura após plaqueadas, por 24 horas e também usou células provenientes cultivo primário, que permaneceram por 48 horas. Este protocolo foi devido ao menor índice de proliferação das células primárias (ciclo celular: 26-36 horas), enquanto nas células imortalizadas o ciclo é bem menor (ciclo celular: 18-20 horas) (FRESHNEY, 2000). No presente estudo as células de origem primária (FPH) também permaneceram mais tempo que as imortalizadas (3T3), porém ao contrário do trabalho dos referidos autores, o material-teste não ficou mais que 24 horas em contato com os FPHs, o que pode ter influência significativa no resultado distinto.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* estão entre os que avaliam a biocompatibilidade dos materiais utilizados na área da saúde, bem como na odontologia (ANUSAVICE et al., 2005; ALBERT et al., 2011). O monômero TEGDMA mostrou provocar apoptose em células pulpares a partir de concentrações de 0,1mM, como no trabalho prévio com BISGMA de Chang et al., (2010). Estes dois monômeros são muito utilizados na composição de adesivos dentinários e isto pode explicar em parte o porquê destes levarem à inflamações pulpares ou outras injúrias mais severas quando usados em dentes com espessuras dentinárias muito pequenas.

Não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando a biocompatibilidade dos monômeros PEG200DMA ou PEG400DMA. Estes monômeros nos FPHs mostraram serem indutores de apoptose, provavelmente pela produção de ROS,

mesmo em baixas concentrações como a de 0,001mM, tendo comportamento similar à outros monômeros amplamente usados na odontologia restauradora adesiva como TEGDMA, HEMA e BISGMA (SPAGNUOLO et al., 2004; CHANG et al., 2005; CHANG et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado que a citotoxicidade de materiais dentários e monômeros, tais como TEGDMA e HEMA, é associada a uma rápida diminuição de Glutathione (GSH). Esta diminuição ocorre porque a GSH desempenha um papel importante na proteção e nos processos de desintoxicação intracelular. A diminuição de Glutathione intracelular por TEGDMA pode contribuir significativamente para a citotoxicidade deste monômero (STANISLAWSKI et al, 2003; SCHWEIKL, SCHMALZ e SPRUSS, 2006; DEMIRCI et al., 2008).

Além disso, o esgotamento de GSH induzido pelos monômeros está associado à produção subsequente de ROS, que por sua vez, pode contribuir para a toxicidade dos materiais em fibroblastos pulpares e gengivais. Radicais livres liberados por monômeros subpolimerizados ou pela ação enzimática quando expostos aos tecidos, podem causar danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, dependendo do acesso destes radicais livres ao DNA-alvo (SCHWEIKL, SCHMALZ e SPRUSS, 2006; CHANG et al., 2010).

A indução de formação de micronúcleos (MN) é considerado como um biomarcador que fornece informações sobre o dano citogenético nos tecidos e processos associados à indução do dano ao DNA (FENECH, 2000), pois tais microestruturas constituem-se por massas de DNA com a aparência de pequenos núcleos achados no citoplasma celular, os quais possuem a capacidade de dividir, representando uma variedade de defeitos de segregação ao DNA (DE ALMEIDA et al., 2004).

Relatório feito após o “5th International Workshop on Genotoxicity Testing” (2009), mostrou haver pouca concordância entre linhagens celulares diferentes, e também pouca especificidade entre as mesmas linhagens permanentes em diferentes

passagens (MATEUCA et al., 2006). Entre os dois tipos celulares usados em nosso ensaio de citotoxicidade, a linhagem permanente 3T3/NIH (FERNANDEZ et al., 2010), foi escolhida para o ensaio de MN por ser a mais homogênea e por apresentar melhor especificidade e reprodutibilidade que as do cultivo primário para este tipo de teste. O uso de células primárias tem sido limitado pela sua vida definida e por mudanças no fenótipo celular, acompanhadas por aumento do número de passagens (LEE et al., 2006).

É necessário para a detecção dos efeitos genotóxicos de uma substância, que inicialmente as células sejam expostas à substância a ser testada, para que seja determinada a concentração ideal para o ensaio de genotoxicidade. Esta concentração deve permitir que um máximo número de células esteja viável, para que sejam bloqueadas no momento da divisão celular em que ocorrem os MN (FENECH, 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2003; LEE et al., 2006; PFUHLER et al., 2011). A concentração determinada para o presente estudo foi a de 0,1mM para todos os monômeros, a qual foi uma concentração intermediária, onde houve possibilidade de divisão celular, por haver viabilidade em considerável número de células e com isto acontecendo a maior formação de MN.

Kirsch-Volders et al. (2003) e Fenech (2000) relatam que deve ser contado um número de 1000 células por experimento / 2 experimentos por material testado. Este número é um padrão mínimo, devido à presença de MN formados espontaneamente, *in vivo* em pessoas saudáveis, ser relativamente baixo, em torno de 0,3 a 0,5% (ROTH, ZECHLINSKI e MARTINO-ROTH, 2002).

Schweikl et al. (2001) em um trabalho onde avaliaram a citotoxicidade e a genotoxicidade de três monômeros TEGDMA, BisGMA e UDMA, em células imortalizadas de roedores, V79. Os monômeros de maior peso molecular (BisGMA e UDMA) foram semelhantes entre si e quase vinte vezes mais citotóxicos que TEGDMA, o qual na concentração de 1mM já promoveu grande quantidade de células apoptóticas, em concordância com nosso trabalho. Neste estudo prévio, o TEGDMA foi tão citotóxico na concentração de 1mM, que reduziu a quantidade de células, na contagem dos MN, o

que mostra nossa concentração de 0,1mM, ideal para este ensaio. Este trabalho prévio, mostrou que quando tratadas com TEGDMA na concentração de 0,5mM, houveram em média 40 células micronucleadas, o que também denota semelhança proporcionalmente com nossos achados, onde na concentração de 0,1mM foram encontradas 7,75 células MN.

A frequência de MN pode variar dependendo do tipo celular e será influenciada pelo tipo de ensaio usado para detectar efeitos genotóxicos. É recomendado que tipos celulares com baixo e estável baseline de frequência de MN sejam usados nestes estudos (células que promovam menos que 25/1000 células MN) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). As células 3T3/NIH usadas em nosso trabalho mostrou frequência de 6,25/1000 células MN no controle/não tratado, o que mostra uma baixa frequência de MN. Além disto, a escolha destas células foi devido à esta população de células terem uma cinética de divisão celular muito bem entendida e controlada (FENECH, 2000).

No ensaio de genotoxicidade, na linhagem 3T3/NIH, somente os monômeros PEG200DMA e PEG400DMA foram diferentes estatisticamente do controle, porém todos apresentaram indução de MN, após o tratamento de 24 horas, o que demonstra genotoxicidade destes materiais, porém em níveis baixos, pois nosso controle (não tratado) teve em média uma frequência de 0,62% de células MN, e o monômero que apresentou maior genotoxicidade teve 1,52% de células MN. Estas taxas não tão altas podem ter ocorrido pela concentração usada ter sido de 0,1mM. Em estudo prévio, as concentrações de TEGDMA de 0,5mM e 0,25mM induziram a formação de aproximadamente 10 MN em fibroblastos de hamster chinês V79, sendo semelhantes ao controle, o que corrobora com nosso estudo (SCHWEIKL et al., 2007).

7 Conclusões

Com as limitações de um estudo *in vitro*, pode-se afirmar que os monômeros metacrilatos de cadeias mais longas, PEG200DMA e PEG400DMA foram os mais citotóxicos nas células primárias pulpares (FPHs). Nas 3T3/NIH, o monômero mais citotóxico foi o TEGDMA. A genotoxicidade destas substâncias aumentou, conforme houve aumento do comprimento das cadeias intermediárias, nas moléculas testadas. A inibição da MMP-2 ocorreu parcialmente em todos os grupos avaliados.

Clinicamente, as quantidades usadas nas formulações adesivas são maiores que as avaliadas neste trabalho, o que sugere a possibilidade do uso destas substâncias, porém maiores investigações necessitam ser realizadas, para que estes resultados possam ser extrapolados para o uso clínico.

8 Referências

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 843P.

ANUSAVICE, K.J. Phillips Materiais Dentários. 11 Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005, 764P.

AUTIAN J. General toxicity and screening tests for dental materials. **International Dental Journal**, v.1, n.24, p.235-250, 1974.

BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDAL-HANSEN B, DECARLO A, ENGLER JA. Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews Oral Biology & Medicine**, v.4:p.197-250,1993.

BODE, W.; MASKOS, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.384, n.6, p.863-72, 2003.

BOUKPESSI, T.; MENASHI, S.; CAMOIN, L.; TENCATE, J.M.; GOLDBERG, M.; CHAUSSAIN-MILLER, C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. **Biomaterials**; v.29:p.4367–73, 2008.

BOUSHELL, L. W.; KAKU, M.; MOCHIDA, Y.; BAGNELL, R.; YAMAUCHI, M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. **Archives of Oral Biology**, v.53, n.2, p.109-16, 2008.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO, E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dental Materials**, v.24, n.1, p.90-101, 2008.

BRESCHI L, MARTIN P, MAZZONI A, NATO F, CARRILHO M, TJÄDERHANE L, VISINTINI E, CADENARO M, TAY FR, DORIGO EDS, PASHLEY DH. Use of a specific MMP inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer. **Dental Materials**, n.26, p.571–8, 2010(a).

BRESCHI L, MAZZONI A, NATO F, CARRILHO M, VISINTINI E, TJÄDERHANE L, RUGGERI A, TAY FR, DORIGO EDS, PASHLEY DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. **Dental Materials**, n.26, p.320–5, 2010(b).

BROWN, S.; BERNARDO, M.M.; LI, Z.H.; KOTRA, L.P.; TANAKA, Y.; FRIDMAN, R.; et al. Potent and selective mechanism-based inhibition of gelatinases. **Journal of American Chemical Society**, v.122, p.6799-6800, 2000.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPOLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **Journal of Dental Research**, v.86, n.1, p.90-4, 2007(a).

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. **Journal of Dental Research**, v.86, n.6, p.529-33, 2007(b).

CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; DE SOUZA, A.P.; SILVA, A.F.; PETZHOLD, C.L.; LINE, S.R.; PIVA, E.; ETGES, A. 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. **European Journal Oral Sciences**, n.117, p.64-7, 2009.

CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; MARQUES, M.R.; DE SOUZA, A.P.; PETZHOLD, C.L.; LINE, S.R.; PIVA, E.; ETGES, A. Inhibition of the activity of matrix metalloproteinase 2 by triethylene glycol dimethacrylate. **Clinical Oral Investigations**, v.10, 2010.

CHANG, H.H.; GUO, M.K.; KASTAN, F.H.; CHANG, M.C.; HUANG, G.F.; WANG, Y.L.; et al. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. **Biomaterials**;26:745 e 53, 2005.

CHANG, M.C.; CHEN, L.I.; CHAN, C.P.; LEE, J.J.; WANG, T.M.; YANG, T.T.; LIN, P.S.; LIN, H.J.; CHANG, H.H.; JENG, J.H. The role of reactive oxygen species and hemeoxygenase-1 expression in the cytotoxicity, cell cycle alteration and apoptosis of dental pulp cells induced by BisGMA. **Biomaterials**. Nov;31(32):8164-71, 2010.

COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research**, v.41, n.2-3, p.321-32, 1976.

DAYAN D, BINDERMAN I, MECHANIC GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. **Archives of Oral Biology**, v.28, p.185-7, 1983.

DE ALMEIDA, T. M.; LEITAO, R. C.; ANDRADE J. D.; BECAK, W.; CARRILHO, F. J.; SONOHARA, S. Detection of micronuclei formation and nuclear 35 anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 150, n. 1, p.16-21, 2004.

DEMIRCI M.; HILLER K.A.; BOSL C.; GALLER K.; SCHMALZ G.; SCHWEIKL H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. **Dental Materials**, v.24, p.362-371, 2008.

DE MUNCK J, VAN MEERBEEK B, YOSHIDA Y, INOUE S, VARGAS M, SUZUKI K, LAMBRECHTS P, VANHERLE G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. **Journal of Dental Research**, v.82, p.136-140, 2003.

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. **Journal of Dental Research**, v.84, n.2, p.118-32, 2005.

DE MUNCK, J.; VAN DEN STEEN, P.E.; MINE, A.; VAN LANDUYT, K.L.; POITEVIN, A.; OPDENAKKER, G.; VAN MEERBEEK, B. Inhibition of Enzymatic degradation of Adhesive-dentin Interfaces. **Journal of Dental Research**, v.88, n.12, p.1101-1106, 2009.

DE MUNCK J, MINE A, VAN DEN STEEN PE, VAN LANDUYT KL, POITEVIN A, OPDENAKKER G, VAN MEERBEEK B. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. **European Journal Oral Sciences**, v.118, n.5, p.494-501, 2010.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v.2, n.3, p.161-74, 2002.

ESSTECH, INC - Disponível em: <<http://www.esstechinc.com/>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FERNÁNDEZ, M.R.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; BEIRA, F.A.; A. ETGES, A.; BUENO, M. Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: a comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth, **International Endodontic Journal**, v.43, p.102-108, 2010.

FRANÇOIS J. The seventh Frederick H. Verhoeff lecture. Collagenase and collagenase inhibitors. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v.75, p.285–315, 1977.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique** (4th Edition). Wiley Liss, Hoboken, NJ, USA, 2000, 319P.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.3, p.437-9, 1999.

GEURTSSEN, W.; LEHMANN, F.; SPAHL, W.; LEYHAUSEN, G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/ additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.41, p.474–480, 1998.

GEURTSSEN, W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. **Critical Reviews Oral Biology & Medicine**, v.11, n.3, p.333- 355, 2000.

GUO, X.; SPENCER, P.; WANG, Y.; YE, Q.; YAO, X.; WILLIAMS, K. Effects of a solubility enhancer on penetration of hydrophobic component in model adhesives into wet demineralized dentin. **Dental Materials**, v.23, n.12, p.1473-81, 2007.

GUSMAN, H.; SANTANA, R. B.; ZEHNDER, M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. **European Journal Oral Sciences**, v.110, n.5, p.353-7, 2002.

HANNAS, A.R.; PEREIRA, J.C.; GRANJEIRO, J.M.; TJÄDERHANE, L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.65, p.1-13, 2007.

HASHIMOTO M.; OHNO H.; SANO H.; KAGA M.; OGUCHI H. In vitro degradation of resin–dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. **Biomaterials**, v.24, p.3795–803, 2003.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **Journal of Dental Research**, v.84, n.8, p.741-6, 2005.

HENN, S.; CARVALHO, R.V.; OGLIARI, F.A.; DE SOUZA, A.P.; LINE, S.R.; DA SILVA, A.F.; DEMARCO, F.F.; ETGES, A.; PIVA, E. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. **Clinical Oral Investigations**, v.Mar 30, 2011.

HUANG, L.L.; CHEUNG, D.T.; NIMNI, M.E. Biochemical changes and cytotoxicity associated with the degradation of polymeric glutaraldehyde derived cross-links. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.24, p.1185-201,1990.

INOKUMA, S.; IDE, H.; YONEKURA, T.; FUNAKI, T.; KONDO, S.; SHIOBARA, S. et al. Synthesis and complexing properties of [2.n](2, 6) Pyridinocrownophanes. The **Journal of Organic Chemistry**, v.70, p.1698–1703, 2005.

INGMAN, T.; SORSA, T.; SUOMALAINEN, K.; HALINEN, S.; LINDY, O.; LAUHIO, A.; SAARI, H.; KONTTINEN, Y.T.; GOLUB, L.M. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. **Journal of Periodontology**, v.64, n.2,p.82-8; 1993.

International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: Switzerland, p.10993–5, 1997.

KASTEN, F. H. Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. **Biotechnic and Histochemistry**, V.78, n.1, p.45-9, 2003.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M., JR.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLES, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v.540, n.2, p.153-63, 2003.

KRIFKA S, SEIDENADER C, HILLER KA, SCHMALZ G, SCHWEIKL H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. **Clinical Oral Investigations**, v.Jan 18, 2011.

LEE, D. H.; LIM, B. S.; LEE, Y.K.; AHN, S. J.; YANG, H. C. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. **Dental Materials**, v. 22, p.1086–1092, 2006.

LINDE, A.; GOLDBERG, M. Dentinogenesis. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.4, n.5, p.679-728,1993.

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Archives of Oral Biology**, v.45, n.9, p.757-65, 2000.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, n.11, p.1515-31, 2006.

MATSUYAMA, H.; ARIMURA, T.; MIYAKE, Y.; TERAMOTO, M. Equilibrium and kinetic studies on complex-formation reaction between crown ethers and bivalent transition-metal ions. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.64, p.2027–29, 1991.

MAZZONI, A.; MANNELLO, F.; TAY, F. R.; TONTI, G. A.; PAPA, S.; MAZZOTTI, G.; DI LENARDA, R.; PASHLEY, D. H.; BRESCHI, L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. **Journal of Dental Research**, v.86, n.5, p.436-40, 2007.

MAZZONI, A.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; GOBBI, P.; ORSINI, G.; RUGGERI, A., JR.; CARRILHO, M.; TJADERHANE, L.; DI LENARDA, R.; BRESCHI, L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.88, n.3, p.697-703, 2009.

MOON, P.C.; WEAVER, J.; BROOKS, C.N. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *Open Dent J.* Jul 20;4:147-52, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

NAKABAYASHI N, KOJIMA K, MASUHARA E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.16, p.265–73, 1982.

NAGASE, H.; VISSE , R., MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v.69, p.562 – 573, 2006.

NISHITANI, Y.; YOSHIYAMA, M.; WADGAONKAR, B.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; MAZZONI, A.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. **European Journal of Oral Sciences**, v.114, n.2, p.160-6, 2006.

NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J.A. Quantitation of protein. **Methods in Enzymology**, v. 463, 2009.

OGLIARI, F.A.; ELY, C.; ZANCHI, C.H.; FORTES, C.B.; SAMUEL, S.M.; DEMARCO, F.F.; PETZOLD, C.L.; PIVA, E. Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development. **Dental Materials**, v.24, p.165-71, 2008.

OSORIO, R.; ERHARDT, M.C.; PIMENTA, L.A.; OSORIO, E.; TOLEDANO, M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds' resistance to degradation. *J Dent Res.*, Aug;84(8):736-40, 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. **Journal of Dental Research**, v.83, n.3, p.216-21, 2004.

PASHLEY D.H.; TAYB F.R.; BRESCHIC L.; TJÄDERHANEL.; CARVALHO R.M.; CARRILHO M.; TEZVERGIL-MUTLUAYI A. State of the art etch-and-rinse adhesives. **Dental Materials**, v.27, n.1, p.1–16, 2011.

PFUHLER, S.; FELLOWS, M.; VAN BENTHEM, J.; CORVI, R.; CURREN, R.; DEARFIELD, K.; FOWLER, P.; FRÖTSCHL, R.; ELHAJOUJI, A.; LE HÉGARAT, L.; KASAMATSU, T.; KOJIMA, H.; OUÉDRAOGO, G.; SCOTT, A.; SPEIT, G. In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop **Mutation Research**, v.723, p.101– 107, 2011.

RAD- SOLUTIONS – Disponível em:

<http://www.rad-solutions.com/Eternal_Products.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2011.

RATANASATHIEN, S.; WATAHA, J.C.; HANKS, C.T; DENNISON, L.B. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **Journal of Dental Research**, v.74, p.1602-1606, 1995.

REICHL, FX; ESTERS, M; SIMON, S; SEISS, M; KEHE, K; KLEINSASSE, N; FOLWACZNY, M; GLAS, J; HICKEL, R. Cell death effects of resin-based dental material compounds and mercurials in human gingival fibroblasts. **Archives of Toxicology**, v.80, p.370–377, 2006.

ROTH, D.M.; ZECHLINSKI, G.; MARTINO-ROTH, M.G. Avaliação da genotoxicidade em cirurgiões-dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.10, n.4, p.209-14, 2002.

SANTOS, M.C.; DE SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; LINE, S.R. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.31, p.660–664, 2004.

SANTOS, J.; CARRILHO, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; PASHLEY, D.; TAY, F.; FERRAZ, C.; TJADERHANE, L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p.686-9, 2009.

SAURO, S.; MANNOCCI, F.; TOLEDANO, M.; OSORIO, R.; PASHLEY, D.; WATSON, T.F. EDTA or H3PO4/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: A microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. **Journal of Dentistry**, v.37, p.279–288, 2009.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G.; SPRUSS, T. The Induction of Micronuclei in vitro by Unpolymerized Resin Monomers. **Journal of Dental Research**, n. 80, v.7, p.1615-20, 2001.

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

SCHWEIKL, H.; HARTMANN, A.; HILLER, K.A.; SPAGNUOLO, G.; BOLAY, C.; BROCKHOFF, G.; SCHMALZ, G. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. **Dental Materials**, v.23, n.6, p.688-95, 2007.

SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; LINE, S.R. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. **Biomaterials**, v.22, p.2025–2030, 2001.

SPAGNUOLO, G.; GALLER, K.; SCHMALZ, G.; COSENTINO, C.; RENGO, S.; SCHWEIKL, H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. **Journal of Dental Research**, v.83, n.9, p.703-7, 2004.

SPENCER, P.; WANG, Y. Adhesive phase separation at dentin interface under wet bonding conditions. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.62, p.447–456, 2002.

STANISLAWSKI, L.; LEFEUVRE, M.; BOURD, K.; SOHEILI-MAJD, E.; GOLDBERG, M.; PÉRIANIN, A. TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. **Journal of Biomedical Materials Research** (part A), v.66, n.3, p.476-82, 2003.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.17, p.463-516, 2001.

SULKALA, M.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; LARMAS, M.; SALO, T.; TJADERHANE, L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. **Archives of Oral Biology**, v.52, n.2, p.121-7, 2007.

TAY, F.R.; PASHLEY, D.H.; SUH, B.I.; HIRAISHI, N.; YIU, C.K. Buonocore memorial lecture. Water treeing in simplified dentin adhesives—deja vu? **Operative Dentistry**, v.30, p.561–79, 2005.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; LOUSHINE, R. J.; WELLER, R. N.; MONTICELLI, F.; OSORIO, R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. **Journal of Endodontics**, v.32, n.9, p.862-8, 2006.

TJADERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, v.77, n.8, p.1622-9, 1998.

TJÄDERHANE, L.; PALOSAARI, H.; WAHLGREN, J.; LARMAS, M.; SORSA, T.; SALO, T. Human Odontoblast Culture Method: The Expression of Collagen and Matrix Metalloproteinases. **Advances in Dental Research**, p.15: 55, 2001.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, v.92, p.827-839, 2003.

WISNIEWSKA-JAROSINSKA, M.; POPLAWSKI, T.; CHOJNACKI, C.J.; PAWLOWSKA, E.; KRUPA, R.; SZCZEPANSKA, J.; BLASIAK, J. Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. **Molecular Biology Reports**, v. dec 3, 2010.

WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.878, p.388-40, 1999.

ZANCHI, C.H.; MÜNCHOW, E.; OGLIARI, F.; CARVALHO, R.; CHERSONI, S.; PRATI, C.; DEMARCO, F.; PIVA, E. A new approach in self-etching adhesive formulations: replacing HEMA for surfactant dimethacrylate monomers. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.jun28, 2011.

ZHANG, S.C.; KERN, M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. **International Journal of Oral Science**, p.163–76, 2009.

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Pelotas



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

PELOTAS, 23 de junho de 2008.

PARECER Nº 026 /2008

O projeto de pesquisa intitulado: **“Citotoxicidade, genotoxicidade e potencial inibitório de MMPs de diferentes moléculas potencialmente aplicáveis na odontologia restauradora adesiva,”** está constituído de forma adequada, cumprindo, na suas plenitudes, preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente, recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Torriani', is written over a horizontal line.

Prof. Marcos Antonio Torriani
Coordenador do CEP/FO/UFPEL.

Prof. Marcos A. Torriani
Coordenador
Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO E DOAÇÃO, LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
natural de _____, gênero _____, RG
_____, residente à
_____, bairro
_____, cidade _____, UF _____, CEP _____,
telefone _____, aceito doar _____ dente(s) permanente(s) para o
Projeto de Pesquisa intitulado “Potencial inibitório da MMP-2 por monômeros
metacrilatos aplicáveis na odontologia restauradora adesiva e sua citotoxicidade e
genotoxicidade”, desenvolvido pela mestrandia Eliana do Nascimento Torre, CRO-RS
10384, sob orientação da professora doutora Adriana Etges, ciente de que o(s)
mesmo(s) será(ão) utilizado(s) para pesquisa, uso clínico, estudo e treinamento pré-
clínico. Estou ciente de que este(s) dente(s) foi (foram) extraído(s) por indicação e
necessidade terapêutica, como documentado em meu prontuário. Este projeto acima
mencionado já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de
Odontologia de Pelotas, sob o Parecer de número 026/2008, e caso este dente seja
utilizado em pesquisa, a minha identidade será preservada na divulgação do trabalho.

Pelotas, ____ / ____ / ____

Assinatura do doador