

CITOCOMPATIBILIDADE DO CIMENTO REPARADOR CERAMICRETE EM CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOBLASTOS HUMANOS.

CYTOCOMPATIBILITY OF THE CERAMICRETE REPAIR CEMENT IN PRIMARY CULTURE OF HUMAN OSTEOBLASTS

Antonio Canabarro, DDS, MSc, PhD¹
Department of Periodontology, Veiga de Almeida University,
Rio de Janeiro, Brazil

Gabriela Quintão de Carvalho Assumpção¹ DDS
Department of Periodontology, Veiga de Almeida University,
Rio de Janeiro, Brazil

Gustavo De-Deus, DDS, MSc, PhD²
Department of Endodontics, UNIGRANRIO, Rio de Janeiro,
Brazil

Érika Thuanne Gonçalves de Souza DDS²
Department of Endodontics, UNIGRANRIO, Rio de Janeiro,
Brazil

Gutemberg Gomes Alves, MSc, PhD³
Clinical Research Unit, Antônio Pedro Hospital, Fluminense
Federal University, Niterói, RJ, Brazil.

Juliana Alves Cortês³ DDS
Clinical Research Unit, Antônio Pedro Hospital, Fluminense
Federal University, Niterói, RJ, Brazil.

Juliana Marins Rotter, DDS, MSc⁴
Department of Endodontics, Rio de Janeiro State University
(UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Adriana Brandão Ribeiro Linhares, MSc, PhD³
Clinical Research Unit, Antônio Pedro Hospital, Fluminense
Federal University, Niterói, RJ, Brazil.

Jose Mauro Granjeiro, DDS, MSc, PhD^{3,5}
Clinical Research Unit, Antônio Pedro Hospital, Fluminense
Federal University, Niterói, RJ, Brazil.
National Institute of Metrology, Standardization and Industrial
Quality (INMETRO), Bioengineering Sector, Rio de Janeiro,
RJ, Brazil

Endereço para correspondência:
Prof. Gustavo De-Deus
Av. Henrique Dodsworth, 85 apto. 808 – Lagoa – Rio de
Janeiro – RJ. CEP 22061-030.

Recebido em 15/06/2011
Aceito em 25/06/2011

RESUMO

Ainda são muito raras as informações sobre a reposta de osteoblastos humanos ao Ceramicrete (CC), um material proposto para ser usado como cimento reparador que apresenta características bastante promissoras. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o grau de citocompatibilidade do CC em culturas primárias de osteoblastos humanos. Para isso, foi utilizado um modelo experimental baseado na quantidade de material usado em uma retro-obturação, criando condi oes mais pr oximas a situa o clínica real. Retrocavidades obturadas com CC foram colocados em poços de cultura contendo meio de cultura (α -MEM), por 24h (n=4). Meios de cultura contendo dentes retro-obturados com ProRoot MTA e OZE foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. Todos os meios foram armazenados. Posteriormente, foram cultivados osteoblastos humanos (2×10^4 células/amostra), por 24h, em poços com os meios armazenados dos 3 materiais. Foi avaliada a citocompatibilidade utilizando um Kit específico (Cytotox Kit, Xenometrix, Alemanha), que possibilita o estudo de 3 parâmetros (XTT, NR e CVDE) utilizando a mesma amostra. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os 3 materiais para todos os 3 parâmetros avaliados (ANOVA, $p < 0,05$). O CC e o MTA foram sempre estatisticamente superiores ao OZE (Duncan, $p < 0,05$). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre os 2 cimentos reparadores, CC e MTA (Duncan, $p > 0,05$). Portanto, pode-se concluir que o Ceramicrete expressa um padrão de citocompatibilidade similar a do MTA, em cultura primária de osteoblastos humanos, quando usado como material retro-obturador.

Palavras-chave: cimentos dentários, obtura o retr grada, osteoblastos.

ABSTRACT

Ceramicrete is an endodontic material with very promising characteristics. However, information about the response of human osteoblasts to CC is very rare. So, the purpose of this study was to assess the cytocompatibility of CC in primary cultures of human osteoblasts. For this, we used a model of retro-obturation, creating conditions close to real clinical situation. The apical portions of canines were retro-obtured with CC or control materials. Then, the teeth were placed in wells containing culture medium (α -MEM) for 24h (n = 4). ProRoot MTA (MTA) and ZOE were used as negative and positive controls, respectively. All media were stored. Subsequently, human osteoblasts were cultured (2×10^4 cells) for 24 h in wells with the stored medium. The cytocompatibility was evaluated using a specific kit (Cytotoxic, Xenometrix, Germany), which enables the study of three parameters of cell viability using the same sample (XTT, NR and CVDE). It was found significant difference among the three materials for all parameters (ANOVA, $p < 0.05$). The CC and the MTA were always statistically superior to ZOE (Duncan, $p < 0.05$). However, no differences were found between the two cements, CC and MTA (Duncan, $p > 0.05$). It can be concluded that CC is an endodontic cement as cytocompatible as MTA when used as a retro-obturation material in primary cultures of human osteoblasts.

Key-Words: dental cements; retrograde obturation; osteoblasts.

Introdução

Os materiais adesivos, recentemente desenvolvidos para obturação do espaço radicular, vem sendo considerados avanços importantes para a endodontia. Entretanto, ainda não são muito claras as vantagens clínicas da utilização desses materiais. Por outro lado, o MTA possui uma história de quase 15 anos de sucesso clínico e experimental comprovado, e por isso, tem sido encarado como o maior avanço no campo dos biomateriais que foram desenvolvidos para uso endodôntico, sendo atualmente recomendado para várias aplicações clínicas.

Em 2007, um conceituado grupo de pesquisa publicou o primeiro resultado experimental com o Ceramicrete (CC), um material reparador alternativo ao MTA (TAY et al., 2007). Trata-se de um material inovador composto por uma cerâmica à base de fosfato. Após a manipulação, o CC toma presa na temperatura ambiente por uma reação tipo ácido-base entre o fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4) e uma solução de óxido de magnésio (MgO , calcinado). Devido às características de impermeabilidade de sua matriz cerâmica composta por fosfato de magnésio e potássio hexaidratado ($\text{KMgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), o CC tem sido utilizado como uma pasta para encapsular lixos radioativos e materiais perigosos (TAY et al., 2007). Assim, a resistência e a versatilidade do CC fizeram dele um excelente material para uma grande variedade de aplicações. Atualmente, o CC pode ser usado como material retroobturador, reparador de perfurações de canal, assim como para o capeamento pulpar, material restaurador temporário, cimento defini-

tivo de coroas protéticas, preenchedor de defeitos ósseos periodontais e como cimento para bandas e brackets ortodônticos.

Sabe-se que a adesão e diferenciação de osteoblastos e a produção de matriz extracelular são afetadas por características físicas, assim como pela composição química dos biomateriais. No entanto, ainda são muito raras informações veiculadas em revistas internacionais [até maio de 2011] sobre este cimento, especialmente sobre a resposta biológica ao CC. Portanto, investigar o comportamento de células osteoblásticas derivadas de osso alveolar humano frente a diferentes materiais, como o CC representa um aspecto fundamental e, portanto, deve ser mais estudado. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o grau de compatibilidade do cimento reparador Ceramicrete em cultura de osteoblastos humanos primários, em comparação ao ProRoot MTA e ao OZE, que foram usados como controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e preparo dos dentes

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Antonio Pedro – UFF (Protocolo N° 232/08). Doze dentes caninos foram selecionados para o estudo. Após a esterilização a 135°C por 35 minutos, foi realizado acesso em todos os dentes. Os canais foram instrumentados em incrementos de 1 mm usando brocas Gates-Glidden 2-6 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e limas K (Dentsply Maillefer). Todos

os dentes foram instrumentados até a lima K 45 a 1 mm aquém do ápice.

As coroas dos dentes foram removidas, sobrando 13 mm da raiz. Os últimos 3 mm apicais foram então removidos, perpendicular ao longo eixo do dente, usando uma broca diamantada (K.G. Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) com auxílio de um microscópio cirúrgico (D. F. Vasconcelos, São Paulo, SP, Brazil) - aumento de 16 X. Todas as raízes foram avaliadas com relação a fraturas ou outros defeitos que interferissem no trabalho. A retro-cavidade foi preparada com uma ponta ultra-sônica (Ø 3 mm, NSK, Brasseler, Savannah, GA, USA). O aparelho foi utilizado em modo Endo com intensidade 5, sob irrigação contínua de água destilada, o que produz cavidades padronizadas de 3 mm de profundidade e 3 mm de diâmetro.

As raízes foram distribuídas aleatoriamente com ajuda de algoritmo online (<http://www.random.org>) para criar assim 3 grupos experimentais semelhantes, com 4 dentes cada para o período experimental definido para o estudo (24h).

Modelo experimental

Doze tubos de Eppendorf de 1,5 mL foram cortados nos 3 mm finais. As raízes obturadas (Figura 1-A) foram colocadas dentro dos tubos, de modo que a porção apical da mesma ficasse 5 mm fora do tubo (Figura 1-B). O-rings de borrachhas (Ø 0.8 cm, figura 1-C) foram colocados na extremidade oposta dos tubos, de modo que os mesmos fossem inseridos nos poços e mantidos em posição (Figura 1-D).

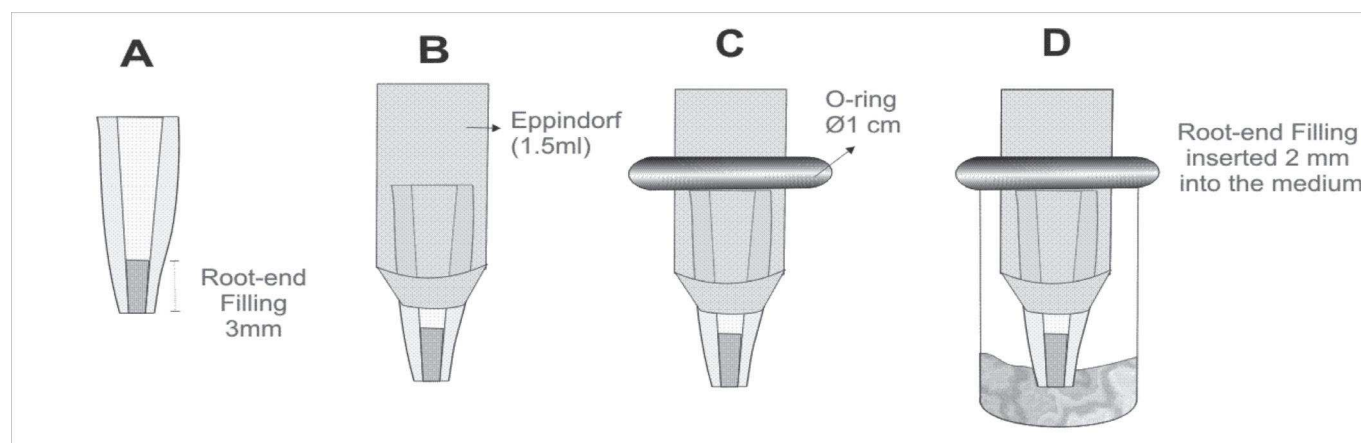


Figura 1. Esquema do modelo experimental, validado em estudo anterior (De-Deus et al., 2009). A: Dente preparado e retro-obturado com os materiais. B: Destes colocados nos Eppendorfs. C: O-rings em posição para estabilizar os Eppendorfs. D: Dentes em posição nos poços, com a porção apical inserida no meio de cultura.

Procedimentos de retro-obturação

O cimento ProRoot MTA® (Dentsply, Tulsa Dental) foi usado como controle negativo e o OZE (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) como controle positivo. O controle positivo e o negativo são utilizados para verificar a sensibilidade do ensaio de citotoxicidade. O controle negativo utilizado deve ser um material que reconhecidamente não cause dano nas células em cultura, i.e. deve ser atóxico, enquanto que por outro lado, o controle positivo deve ser um material reconhecidamente seja capaz de causar dano celular, ou seja, deve ser citotóxico (Daguano et al., 2007).

As retro-obturações foram realizadas em fluxo laminar. Um grama de ProRoot MTA® (Dentsply, Tulsa

Dental) e de CC (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA) foi misturado a 0,35 mL de água destilada, de acordo com as recomendações do fabricante. A manipulação do OZE também seguiu as recomendações do fabricante. As cavidades foram preenchidas com instrumento Endogun (Medidenta Int. Inc., Woodside, NY, USA).

Meios Teste

Após a retro-obturação, todos os dentes foram inseridos imediatamente em placas de cultura contendo 48 poços (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) como mostrado na figura 1 e mantidos nos mesmos por 24h, em contato com 0.5 mL de meio Alpha-MEM (Gibco, Cergy-Pontoise, France) contendo 10% de soro fetal

bovino (Biowhittaker, Gagny, France) suplementado com 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 U.mL⁻¹ de estreptomicina. Após o período estabelecido, os meios foram armazenados em recipientes estéreis, e mantidos em estufa a 37°C.

Cultura primária de osteoblastos humanos

Foram obtidos fragmentos (explantes) de osso alveolar humano, de doadora jovem e saudável, que foi submetida a procedimento cirúrgico ortopédico, realizado na Hospital Universitário Antonio Pedro. Células humanas osteoblasticas (HOCs) foram obtidas destes explantes por digestão enzimática, usando Colagenase tipo II (Gibco – Life Technologies, Grand Island, NY) conforme estudo anterior (Mailhot, 1998) e cultivadas em garrafas de 75 cm² (Falcon, NJ, EUA) contendo meio Alpha-MEM (Gibco), suplementado por soro fetal bovino a 10% (Gibco), e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até a subconfluência, quando eram removidas das garrafas, usando uma solução com 1 mM de EDTA (Gibco) e 0.25% de tripsina (Gibco). As células, sempre na segunda passagem, eram transferidas para placas de cultura de 48 poços (Falcon, Franklin Lakes, NJ), por 24 horas, na densidade de 20.000 células/poço, usando os meios armazenados dos materiais como meio de cultura. Durante a cultura, as células eram mantidas a 37°C em estufa, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar.

Citocompatibilidade

O ensaio de citocompatibilidade foi realizado usando um kit comercial (Cytotox Kit, Xenometrix, Alemanha), que permite o estudo de 3 parâmetros diferentes de viabilidade/integridade celular na mesma amostra. Os testes foram: XTT, Vermelho Neutro (NR) e Corante Cristal Violeta (CVDE). O teste **XTT** se baseia na capa-

cidade da enzima desidrogenase mitocondrial das células em converter o sal tetrazolium amarelo solúvel em água em uma solução de compostos de formazan de cor laranja, medido em absorbância a 480 nm (SCUDIERO et al., 1988). O teste **NR** é um teste de viabilidade/sobrevivência que se baseia na capacidade das células em incorporar o corante vermelho neutro nos seus lisossomos, que se acumula em células com membrana intacta; a quantidade de corante incorporado é medida a 540 nm. **CVDE** é um ensaio que avalia a densidade celular pela coloração do DNA; após a eliminação do excesso de corante, a absorbância de 540 nm é proporcional a quantidade de células nos poços. A absorbância para os 3 métodos de detecção colorimétrica foi medida com um espectrofotômetro de microplacas UV/Vis (PowerWave MS2, BioTek Instruments, USA).

Análise estatística

Os dados dos testes citocompatibilidade foram expressos em média e desvio padrão. Após a aplicação de teste de normalidade, foi utilizado o teste ANOVA (distribuição normal dos dados) para comparação entre os valores relacionados ao material teste (CC) e aos materiais controle, MTA e OZE. Foram utilizadas 4 amostras. Foi estabelecido o valor de p em 0,05 para as análises estatísticas.

RESULTADOS

Os valores encontrados relacionados aos 3 parâmetros estudados encontram-se na tabela 1. Tanto o CC como o MTA apresentaram valores estatisticamente superiores ao OZE, após 24h, para os 3 parâmetros avaliados (Tabela 1). Entretanto, não foram encontradas diferenças entre o CC e o MTA, para os parâmetros estabelecidos (Tabela 1).

Tabela 1. Cimentos e parâmetros avaliados após 24 h em cultura de osteoblastos humanos.

Cimentos	Parâmetros		
	XTT	NR	CVDE
MTA	0,59 (0,05)	0,68 (0,10)	0,12 (0,01)
CC	0,67 (0,03)	0,67 (0,06)	0,03 (0,01)
OZE	0,34 (0,04)	0,39 (0,09)	0,00 (0,00)

ANOVA, complementado por Duncan (p > 0,05): MTA=CC > OZE.

Discussão

Os resultados do presente trabalho mostram que o material CC apresenta citocompatibilidade similar ao MTA, *in vitro*, usando cultura primária de osteoblastos humanos.

O CC, um material alternativo ao MTA, é um material inovador, composto por uma cerâmica à base de fosfato. Embora apresente um pH ácido, diferente do MTA que apresenta pH alcalino (PORTER et al., 2010), tanto a alta resistência quanto a baixa porosidade, são características de extrema relevância considerando o uso odontológico. Além disso, o CC libera flúor, apresenta boa radiopacidade, apresenta baixa temperatura durante a reação exotérmica, boa estabilidade dimensional, parece ser bioativo, ou seja, estima-se que pode estimular a formação óssea e o reparo de lesões (TAY et al., 2007) e tem boa adesividade à estrutura dentária, o que o leva a promover um selamento apical similar ao MTA (LEAL et al., 2011). Assim, pode ser usado como cimento obturador e retro-obturador do canal radicular, material reparador de perfurações de canal, material de capeamento pulpar e como preenchedor de defeitos ósseos periodontais (TAY et al., 2007).

A cultura de células é um modelo *in vitro* que oferece oportunidades únicas na investigação da formação tecidual e da citocompatibilidade. As vantagens desta metodologia nas pesquisas envolvendo materiais dentários são inúmeras, entre elas: a natureza homogênea das células, uma boa definição do curso dos eventos, custos relativamente reduzidos, possibilidade de derivar múltiplas culturas e a redução da mortalidade de animais (COOPER et al., 1998).

Quando um material é instalado cirurgicamente no corpo, uma série de reações acontece na sua superfície e próximo a ele. O material é exposto a diferentes íons, polissacarídeos, proteínas e células como condroblastos, fibroblastos e osteoblastos. A resposta celular depende das características superficiais dos materiais e de suas propriedades químicas (BRUNETTE, 1988).

No presente estudo, foi usado ensaio de viabilidade celular que utiliza parâmetros combinados. Trata-se de um método simples de ser realizado e facilmente reproduzível, relativamente barato, que trás informações relevantes em relação a citocompatibilidade. O kit permite a avaliação simultânea de 3 parâmetros: (1) XTT, que mede o metabolismo celular, através da atividade

mitocondrial, (2) NR, que estuda a integridade celular, através da permeabilidade da membrana citoplasmática e (3) CVDE, que estabelece a densidade celular, pela presença de DNA. Este método, por sua maior sensibilidade, aumenta a chance de detectar efeitos biológicos, permite a correlação de diferentes parâmetros, que se complementam, e, assim, possibilita o estudo da citocompatibilidade de forma bastante apropriada. Nenhum trabalho foi encontrado [Maio de 2011] associando a compatibilidade do CC ao comportamento de células osteoblásticas humanas primárias. Portanto, o presente trabalho tem o mérito de estabelecer pela primeira vez a viabilidade de osteoblastos cultivados com meios que estiveram em contato com o CC por 24h. Como ele pode ter o potencial de ser bioativo (referencia), esta característica, se confirmada, aliada a sua compatibilidade similar a do MTA, poderá colocá-lo como uma excelente opção quando se espera a reparação de defeitos ósseos em endodontia e periodontia.

Portanto, pode-se concluir que o CC é um cimento com citocompatibilidade similar a do MTA, em cultura primária de osteoblastos humanos, pelo período de 24h, quando usado como material retro-obturador.

Agradecimento

Este projeto foi financiado pela FAPERJ, Edital APQ1, 2009.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tay KC, Loushine BA, Oxford C, Kapur R, Primus CM, Gutmann JL et al. In vitro evaluation of a Ceramicrete-based root-end filling material. J Endod. 2007; 33:1438-43.
2. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. J Endod. 2009; 35: 1387-90.
3. Daguano JKMF, Santos C, Rogero SO. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. Rev Materia. 2007; 12: 134-9.
4. Mailhot JM, Borke JL. An isolation and *in vitro* culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. Clin Oral Implants Res. 1998; 9: 43-50.

5. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988; 48: 4827-33.
6. Porter ML, Berto A, Primus CM, Watanabe I. Physical and chemical properties of new-generation endodontic materials. *J Endod.* 2010; 36: 524-8.
7. Leal F, De-Deus G, Brandão C, Luna AS, Fidel SR, Souza EM. Comparison of the root-end seal provided by bioceramic repair cements and White MTA. *Int Endod J.* 2011. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01871.x.
8. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13: 163-74.
9. Brunette DM. The effect of implant surface topography on the behaviour of cells. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 1988; 3: 231-46.