

VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGOS APÓS O CONTATO COM ETIL-CIANOACRILATO: UM ESTUDO IN VITRO

Palavras-Chave: CIANOACRILATO, BIOCOMPATIBILIDADE, FIBROBLASTOS

Autores(as):

ANA JULIA PUPPIN DE CAMPOS TOLEDO, FOP – UNICAMP

DANIEL FELIPE FERNANDES PAIVA, FOP – UNICAMP

VICTOR AUGUSTO BENEDICTO DOS SANTOS, FOP - UNICAMP

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROppo (orientador), FOP - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Na odontologia, há a busca constante por rapidez e eficiência clínica, juntamente com o melhor custo-benefício possível. Assim, o uso de materiais com custo acessível, quando corretamente indicados, podem ser inseridos na prática clínica, com economia de insumos e maior eficiência. É o caso da cola Super Bonder®, um adesivo composto por etil-cianoacrilato, com potencial uso para a região maxilofacial, julgando ser um material biocompatível com osteoblastos (De Melo et al, 2013).

Adesivos à base de cianoacrilato já são utilizados na área médica, principalmente em cirurgias. Dermabond® (2-octil-cianoacrilato) é aplicado para o fechamento de incisões cirúrgicas, em associação a suturas (Dafford e Anderson, 2013). Ainda, há aplicação em situações mais invasivas: em estudo in vivo com porcos, o adesivo composto por 2-octil-cianoacrilato (LiquiBand®) se mostrou uma alternativa eficaz e atóxica para auxiliar no fechamento de defeitos no disco intervertebral (Kang et al, 2015).

Com enfoque na área odontológica, o uso da cola Super Bonder® tem grande potencial de exploração, justificado além da biocompatibilidade do produto. Estudos in vitro corroboram e indicam o uso da cola para cirurgias maxilofaciais, para fixar enxertos ósseos autólogos, que se mostrou ter a mesma eficiência e maior estabilidade do que parafusos (Saska et al, 2009), o que reduz o alto custo demandado para a realização do procedimento.

Para corroborar com a aplicação prática de Super Bonder® na cavidade oral, é necessário a avaliação do comportamento dessa cola, composta por etil-cianoacrilato, em relação aos tecidos e células presentes, principalmente em relação aos fibroblastos. Os mesmos, são importantes células que atuam na formação da matriz extracelular, a partir da síntese de colágeno e estão presentes no tecido conjuntivo, o qual compõe os tecidos periodontais e a mucosa bucal (Plikus et al, 2021).

Dessa forma, o presente estudo *in vitro* busca verificar a viabilidade celular e toxicidade de cultura de células da linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de ratos) após o contato com adesivos a base de etil-cianoacrilato.

METODOLOGIA:

Para a cultura celular, foram utilizados fibroblastos embrionários de camundongos imortalizados (NIH 3T3), cultivados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) high glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino, glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e gentamicina (10 µg/mL). A cultura foi mantida em uma estufa com 5% de CO₂ a 37 °C e o crescimento das células ocorreu em placas de Petri para cultura de tecidos (100 x 20 mm). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata, utilizando uma confluência de aproximadamente 80% e a densidade celular utilizada nos experimentos foi adquirida em uma curva de semeadura (500,000-7,812 células/mL) por 100 µL em cada poço de uma placa de 96 poços, compreendendo a melhor densidade aquela que atingisse a absorbância entre 0,75 e 1,25 em 24 horas de experimento utilizando a redução de MTT conforme orientação do fabricante, resultado na densidade de 62.500 células/mL.

Após o cultivo, as células foram expostas ao extrato de *Hancornia speciosa* Gomes, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em pH 7,4 e Super Bonder Original® (etil-cianoacrilato) e foram diluídas em DMEM suplementado de forma seriada (10%; 5%; 2,5%; 1,25% e 0,625%). Um grupo sem tratamento foi utilizado como controle. As células da placa de 96 poços foram expostas à 100 µL de cada diluição em sextuplicata e incubadas por 24 horas.

Para o teste de viabilidade celular, utilizou-se o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina). Após o período de incubação de 24 horas, os meios de tratamentos foram removidos e adicionou-se 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) em 100 µL de DMEM em cada poço, de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante. As placas foram incubadas por 4 horas sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Por fim, os poços foram secos e receberam 100 uL de DMSO (dimetilsulfóxido), responsável por dissolver os cristais de formazan e possibilitar a medição da absorbância, lidas em espectrofotômetro de placas em 540 nm, com correção de 650 nm, posteriormente convertidas em porcentagem de viabilidade.

Para análise dos dados, o teste ANOVA foi realizado para comparação das concentrações entre os grupos e o teste ANOVA de medidas repetidas foi utilizado para comparar as diferentes concentrações de cada tratamento. O nível de significância foi definido por p=0.05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A tabela 1 dispõe a viabilidade celular dos fibroblastos após os tratamentos e teste de MTT. Os dados consideraram a média da absorbância do grupo controle como 100% de viabilidade.

	10%	5%	2,5%	1,25%	0,625%
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	91,06 (±3,22)	97,31 (±3,15)	100,9 (±5,57)	111,4 (±3,61)	113,3 (±5,61)
EDTA pH 7,4	2,529 (±1,78)	9,12 (±4,47)	7,64 (±4,81)	7,50 (±4,67)	9,30 (±5,59)
Super Bonder Original	3,87 (±1,82)	7,69 (±3,92)	10,09 (±1,10)	10,41 (±3,81)	15,77 (±3,19)

Tabela 1. viabilidade celular em porcentagem (\pm desvio-padrão)

A comparação da viabilidade celular entre os grupos está apresentada na figura 1.

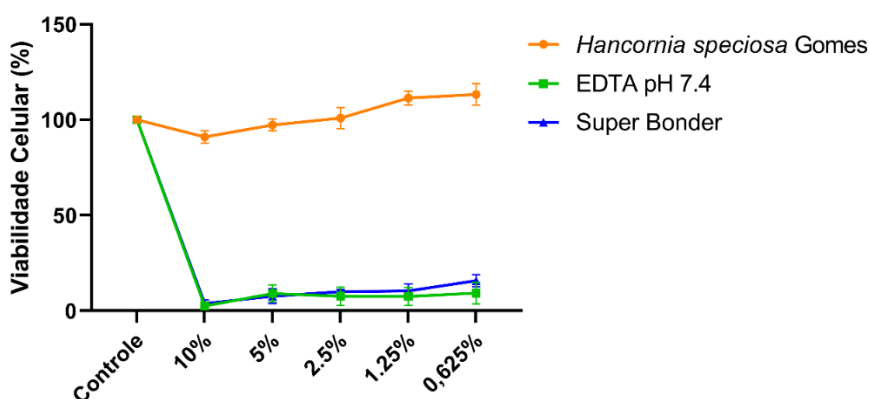


Figura 1. Viabilidade celular apresentada em média e desvio-padrão

Com base nos resultados obtidos e apresentados, após a realização do teste de MTT, nota-se que houve redução da viabilidade celular em todos os grupos de tratamentos, em comparação com os fibroblastos que não receberam nenhum tratamento (grupo controle). Houve diferença estatística entre o grupo tratado com *Hancornia speciosa* Gomes e os grupos EDTA e Super Bonder, em todas as concentrações testadas ($p < 0.001$).

Dentre as amostras tratadas, o grupo de fibroblastos expostos ao extrato de *Hancornia speciosa* Gomes exibiu o melhor percentual de viabilidade celular. Quando em menor diluição, de 10%, menos de 9% das células foram classificadas, de acordo com a absorvância aferida, como inviáveis, enquanto que, em comparação com maiores diluições, 1,25% e 0,625 ($p < 0.001$ e $p = 0.005$, respectivamente), houve diferença estatística, com crescimento celular, de forma diretamente proporcional: quanto maior a diluição, maior é a viabilidade celular. Esse comportamento pode ser explicado pela biocompatibilidade da *Hancornia speciosa*, popularmente conhecida como Mangaba, com os tecidos humanos, bem como seu potencial angiogênico e anti-inflamatório (Paiva et al, 2023).

Em relação às células expostas ao etil-cianoacrilato e ao EDTA, não houve diferença estatística significativa entre a viabilidade celular dos grupos, em todas as concentrações testadas.

O EDTA, uma substância utilizada como quelante durante o preparo químico-mecânico de procedimentos endodônticos, é amplamente utilizado na odontologia, porém, apresenta potencial irritante aos tecidos e células periapicais, o que inclui os fibroblastos gengivais (Bilvinaite et al, 2022). Como o efeito do EDTA sobre os tecidos é relacionado com a concentração, nota-se que a maior porcentagem de células viáveis ocorre quando a diluição é maior (0,625%) (Elfarraj et al, 2024). Ainda, pode-se observar que a viabilidade é mais expressiva nas diluições de 0,625% e 5%, em ordem decrescente, enquanto os menores valores se encontram quando as amostras foram diluídas a 10%, 1,25% e 2,5%, em ordem crescente. Porém, não há diferença significativa entre as concentrações de EDTA ($p=0.138$).

Apesar de não apresentar citotoxicidade para os fibroblastos da cavidade oral, o tamanho das cadeias laterais presentes nas moléculas de etil-cianoacrilato pode justificar os achados. Quanto menores essas cadeias, a possibilidade de toxicidade é aumentada, por conta da presença de subprodutos oriundos da degradação do adesivo (Andreotti et al, 2019; Saska et al, 2009). Bem como notado no tratamento de extrato de *Hancornia speciosa*, quando os fibroblastos são expostos a Super Bonder, quanto maior a diluição, maior a viabilidade celular e quando comparadas as concentrações, a diferença entre a maior, 10%, e a menor, 0,625% é significativa ($p=0.007$).

Ademais, como já observado em outro estudo, a associação do etil-cianoacrilato com o extrato de *Hancornia speciosa* para a fixação de enxertos ósseos, se mostrou eficaz e biocompatível, pois o adesivo não impediu a formação óssea, além de causar pouco efeito inflamatório (Paiva et al, 2023).

CONCLUSÃO:

Com base no exposto, podemos concluir que, apesar de estudos comprovarem a biocompatibilidade do etil-cianoacrilato com os tecidos humanos, o crescimento dos fibroblastos foi prejudicado quando em contato com esse adesivo. O extrato de *Hancornia speciosa*, em contrapartida, apresentou superior, com melhor potencial biológico em relação aos fibroblastos, com pouca interferência com crescimento dessas células, quando em maior concentração e permitindo crescimento celular, em concentrações mais baixas e, dessa forma, se mostrou biocompatível. Assim, sugere-se que novas pesquisas in vivo devem ser realizadas para uma melhor compreensão do potencial de uso da cola Super Bonder na cavidade oral.

BIBLIOGRAFIA

Andreotti Damante C, Cardoso MV, Hage Karam PSB, Haiter AC, Sant'ana ACP, Gregghi SLA, Zangrando MSR, De Rezende MLR, Oliveira RC. **Evaluation of Regular Market Ethyl Cyanoacrylate Cytotoxicity for Human Gingival Fibroblasts and Osteoblasts.** Surg Infect (Larchmt). 2020 Feb;21(1):29-34. doi: 10.1089/sur.2019.141. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397637.

Bilvinaite G, Zongolaviciute R, Drukteinis S, Bukelskiene V, Cotti E. **Cytotoxicity and Efficacy in Debris and Smear Layer Removal of HOCl-Based Irrigating Solution: An In Vitro Study.** J Funct Biomater. 2022 Jul 15;13(3):95. doi: 10.3390/jfb13030095. PMID: 35893463; PMCID: PMC9326542.

Dafford EE, Anderson PA. **Comparison of dural repair techniques.** Spine J. 2015 May 1;15(5):1099-105. doi: 10.1016/j.spinee.2013.06.044. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23973097.

De Melo WM, Maximiano WM, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. **Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures.** J Oral Maxillofac Surg. 2013 Jan;71(1):35-41. doi: 10.1016/j.joms.2012.09.002. Epub 2012 Oct 26. Erratum in: J Oral Maxillofac Surg. 2013 Apr;71(4):824. PMID: 23102812.

Elfarraj H, Lizzi F, Bitter K, Zaslansky P. **Effects of endodontic root canal irrigants on tooth dentin revealed by infrared spectroscopy: a systematic literature review.** Dent Mater. 2024 Aug;40(8):1138-1163. doi: 10.1016/j.dental.2024.05.014. Epub 2024 Jun 1. PMID: 38825554.

Kang R, Li H, Lysdahl H, Quang Svend Le D, Chen M, Xie L, Bünger C. **Cyanoacrylate medical glue application in intervertebral disc annulus defect repair: Mechanical and biocompatible evaluation.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2017 Jan;105(1):14-20. doi: 10.1002/jbm.b.33524. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26372292.

PAIVA, Daniel Felipe Fernandes. **Effect of the mixture of ethyl-cyanoacrylate and latex from "Hancornia speciosa (Gomes)" on bone regeneration in rats** 2023. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba Dental School, Piracicaba, SP. <https://hdl.handle.net/20.500.12733/8149>.

Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, Driskell RR, Rosenthal N, Biernaskie J, Horsley V. **Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease.** Cell. 2021 Jul 22;184(15):3852-3872. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.024. PMID: 34297930; PMCID: PMC8566693.

Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MF, Capela MV, Gabrielli MA. **Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits.** Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 Feb;38(2):180-6. doi: 10.1016/j.ijom.2008.12.004. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19157782.