

Genotoxicidade associada a adesivos dentários de uso odontológico

STELA MARIS DA SILVA CARIATI¹

GUILHERME ANZILIERO AROSSI²

HELOISA HELENA RODRIGUES DE ANDRADE³

RESUMO

*Monômeros livres resultantes da polimerização incompleta de materiais dentários tendem a liberação e a interação com tecidos vivos, podendo gerar danos genéticos. O teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* foi aplicado para testar a ação de dois adesivos dentários como indutores de mutações gênicas e/ou cromossômicas, assim como recombinação mitótica. Ambos os **Adesivos A e B** induziram incrementos estatisticamente significantes na frequência total de clones mutantes, principalmente no genótipo trans-heterozigoto – indicando que a toxicidade genética atribuída a ambas resinas deve-se basicamente à indução de recombinação entre cromossomos homólogos – um evento que está relacionado com a perda da heterozigose e associado à indução de câncer.*

Palavras-chave: Monômeros livres, SMART, genotoxicidade.

¹ Acadêmica do Curso de Biologia da ULBRA. Bolsista PIBIC/CNPq.

² Aluno Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada da ULBRA.

³ Professora-Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA e Coordenadora do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (Heloisa@ulbra.br).

ABSTRACT

Free monomers from incomplete polymerization of dental materials tend to release and interact with living tissue, and can generate genetic damage. The SMART test was applied to investigate their action as genotoxins. Adhesive A and Adhesive B induced statistically significant increases in the frequency of total spots. These findings indicate that both adhesives are inducers of toxic-genetic events, being the mitotic recombination the main mechanism of action, which is related to the loss of heterozygosity and associated with cancer induction.

Keywords: *Free monomers, SMART, genotoxicity.*

INTRODUÇÃO

Os materiais resinosos comercialmente disponíveis são encontrados na forma de resinas compostas, cimentos resinosos, adesivos dentais, e uma variedade de outros produtos, utilizados na clínica diária para a terapêutica de reabilitação oral em Odontologia. Suas matérias-primas são monômeros resinosos tais como BisGMA (Bisfenol A glicidilmetacrilato), TEGDMA (triêtilenoglicoldimetacrilato), UDMA (uretanodimetacrilato) e HEMA (hidroxietilmetacrilato). Estes materiais sofrem um processo de ativação que determina o início da polimerização, podendo demorar até um mês para se esgotar completamente (WATTS, McNAUGHTON e GRANTS, 1986). Contudo, nem todo monômero originalmente presente é consumido, propiciando a formação de radicais livres de cadeias carbônicas dentro do material (AROSI, 2004).

Diversos estudos têm fornecido evidência da permanência de cerca de 5% de monômeros livres, que são capazes de reagir com outros grupos de radicais carbônicos ou até mesmo com átomos de oxigênio e hidrogênio, por afinidade eletrônica ou polaridade (FERRACANE, 1985;

KILDAL e RUYTER, 1993; PARK e LEE, 1996; BAGIS e RUEGGERBERG, 1997). A biocompatibilidade é outra desvantagem atribuída aos monômeros (GEURTSSEN, 2000). Uma vez difundidos nos tecidos vivos, eles podem provocar diferentes tipos de interações com os mais diversos receptores e estruturas celulares.

Em função das características destes materiais, o estudo do seu potencial tóxico-genético vem sendo investigado através de diferentes bioensaios, que privilegiam a detecção de eventos específicos como perda de cromossomos inteiros (aneugênese) e/ou perda de segmentos cromossômicos (clastogênese). Os monômeros BisGMA; UDMA; TEGDMA; GMA (glicidilmetacrilato); Bisfenol A; MMA (metilmetacrilato) e HEMA não aumentam as taxas de revertentes no teste de Ames, indicando que tais produtos não induzem mutações pontuais em procariotos. No entanto, TEGDMA tem efeito comprovadamente clastogênico, sendo mutagênico segundo o ensaio HPRT, enquanto que BisGMA e UDMA não apresentaram atividade significativa como indutores de mutações - ainda que seus subprodutos GMA e Bisfenol A tenham causado aumento na indução de micronúcleos em cultura de células V79

(SCHWEIKL, SCHMALZ e RACKEBRANDT, 1998; SCHWEIKLL, SCHMALZ e SPRUSS, 2001). Por outro lado, BisGMA, TEGDMA, UDMA, HEMA não provocaram quebras cromossômicas em linfócitos humanos saudáveis no teste do cometa - quando avaliados em doses compatíveis com valores menores do que 25% de mortalidade (KLEINSASSER et al., 2004).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar, através do Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, os **Adesivos A e B**. Tem como objetivos específicos qualificar a ação mutagênica, clastogênica e/ou recombinogênica dos produtos em estudo e quantificar a contribuição da recombinação mitótica e da mutação gênica e/ou cromossômica para a genotoxicidade total dos materiais em estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados na pesquisa foram dois adesivos dentários nomeados como: (i) **Adesivo A**, composto por uma associação de diferentes monômeros, tais como o BisGMA, HEMA, UDMA, além de ativadores e solvente a base de álcool e água e (ii) **Adesivo B**, agente de união que apresenta UDMA e HEMA como monômeros constituintes e solvente a base de acetona. Os adesivos foram diluídos em água até que a quantidade do solvente, água ou álcool, atingisse uma concentração de 5%.

O Teste SMART de asa baseia-se na identificação de pêlos com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA. Tais alterações

são primordialmente induzidas nas estruturas que darão origem às asas dos adultos com seus tricomas, que se organizam em manchas, com fenótipos característicos - que indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica.

Foram utilizadas linhagens de *Drosophila melanogaster* designadas como *flr³* (*flr³/In(3LR)TM3,ri p^b sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*), e *mwh* (*mwh/mwh*). Para maiores esclarecimentos a respeito dos marcadores genéticos acima apresentados, ver Lindsley e Zimm (1992). Nesta abordagem experimental foi empregado o cruzamento padrão, no qual fêmeas virgens *flr³* foram cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450. Este cruzamento originou larvas com duas constituições genotípicas, no que se refere aos genes marcadores localizados no cromossomo 3:

- Larvas *mwh* +/ + *flr³* - que são trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³*.
- Larvas *mwh* +/TM3,Bd^S - heterozigotas para o cromossomo TM3, necessário para balancear o marcador *flr³*, já que este é letal em homozigose (GARCIA-BELLIDO e DAPENA, 1974).

Os cruzamentos foram realizados em massa (80 fêmeas: 40 machos), durante três dias, em vidros contendo meio de cultura padrão. Após este período, os casais foram transferidos para tubos de ¼ de litro contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por oito horas. Passado este tempo, os adultos foram descartados. Depois de

72 horas do início do período de ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio, por flotação em água corrente. Estas larvas foram, então, submetidas a tratamento crônico com diferentes diluições dos compostos.

Todos os adultos que nasceram 10-12 dias após a postura dos ovos foram conservados em etanol 70%. Posteriormente, as asas dos indivíduos trans-heterozigotos e heterozigotos TM3 foram submetidas à montagem em lâminas de vidro, contendo 10 asas de fêmeas e 10 asas de machos, e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400 X. Foram analisadas as asas de 30 indivíduos de cada sexo, por concentração do composto, observando-se os fenótipos dos tricomas existentes nas superfícies dorsal e ventral das asas. Os diferentes tipos de manchas são designados como simples *mwh* ou *flr*³, quando apenas um dos marcadores se expressa, ou como manchas gêmeas, quando tanto pêlos múltiplos (*mwh*), como pêlos com a base alargada (*flr*³) estão presentes dentro de uma mesma mancha.

Analisando o genótipo heterozigoto TM3, que expressa somente manchas originadas por mutações pontuais e cromossômicas, pode-se quantificar o papel da recombinação mitótica

enquanto mecanismo de ação genotóxica da droga. Para se fazer a avaliação genotóxica dos adesivos, as diferentes diluições foram comparadas com seus respectivos controles-negativos. A análise estatística foi realizada através do teste Binominal Condicional (Kastenbaum e Bowman) e os diagnósticos positivos foram confirmados através do teste não-paramétrico de Wilcoxon, Mann e Whitney (teste U) (FREI e WÜRGLER, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é apresentado o somatório de resultados obtidos através do teste SMART de asa de *Drosophila melanogaster*, considerando a resposta de imagos do cruzamento padrão, portadores dos genótipos trans-heterozigotos (*mwh/flr*³) e heterozigoto TM3 (*mwh*/TM3), após a exposição crônica aos Adesivos A e B. Foram testadas três concentrações e um controle negativo para cada droga. As soluções de solventes, utilizadas como controles negativos, foram comparadas aos grupos testes para a identificação de aumento estatisticamente significativo na frequência de indução de manchas mutantes.

Tabela 1 - Dados referentes à indução de manchas mutantes após tratamento crônico com adesivos dentais comercialmente disponíveis — **Adesivo A** e **Adesivo B** — obtidos através do cruzamento padrão do teste SMART.

Genótipo	Diluição (%)	No. de moscas (N)	Manchas por mosca (diagnóstico estatístico) ^a			
			Manchas simples pequenas ^b (1-2 células) <i>m</i> =2	Manchas simples grandes ^b (> 2 células) <i>m</i> =5	Manchas gêmeas <i>m</i> =5	Total de manchas <i>m</i> =2
Adesivo A						
<i>mwh/flr</i> ³	C N	30	0,93 (28)	0,07 (02)	0,00 (00)	1,00 (30)
	2,5	30	0,97 (29) -	0,07 (02) i	0,03 (01) i	1,07 (32) -
	3,75	30	1,07 (32) -	0,10 (03) i	0,03 (01) i	1,20 (36) -
	5,0	30	1,43 (43) +	0,20 (06) i	0,00 (00) i	1,63 (49) +
	C N	30	0,50 (15)	0,00 (00)	^c	0,50 (15)
	2,50	30	0,37 (11) -	0,13 (04) i		0,50 (15) -
	3,75	30	0,37 (11) -	0,00 (00) i		0,37 (11) -
	5,0	30	0,30 (09) -	0,07 (02) i		0,37 (11) -
Adesivo B						
<i>mwh/flr</i> ³	C N	30	0,40 (12)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,57 (17)
	1,0	30	0,87 (26) +	0,07 (02) i	0,07 (02) i	1,00 (30) +
	1,5	30	1,00 (30) +	0,07 (02) i	0,27 (08) i	1,33 (40) +
	2,0	30	0,87 (26) +	0,40 (12) +	0,13 (04) i	1,40 (42) +
	C N	30	0,37 (11)	0,07 (02)	^c	0,43 (13)
	1,0	30	0,37 (11) i	0,00 (00) i		0,37 (11) -
	1,5	30	0,30 (09) -	0,10 (03) i		0,40 (11) -
	2,0	30	0,77 (23) +	0,03 (01) i		0,80 (24) +

^a Diagnóstico estatístico segundo Frei e Würzler (1998): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; *m*, fator de multiplicação para estabelecimento de resultado negativo significativo. Nível de significância $\alpha = \beta = 0,05$. ^b Incluindo manchas *flr*³ raras. ^c Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas no heterozigoto *mwh/TM3* já que o cromossomo balanceador *TM3* não carrega a mutação *flr*³. CN = controle negativo.

O **Adesivo A** promoveu um aumento na frequência de indução de manchas mutantes nas asas de moscas trans-heterozigotas, o que o caracteriza como genotoxina de ação direta – com diagnóstico positivo na maior concentração. Assim, para identificação do tipo de dano que o xenobiótico induz, foram analisadas moscas do genótipo heterozigoto *TM3*, que expressam exclusivamente mutação gênica e/ou cromossômica – não tendo sido observado aumento significativo na indução de manchas mutantes. Isso classifica o fármaco como indutor da recombinação mitótica. Já o **Adesivo B** apresentou resultado positivo confirmado nas três concentrações testadas quando foram avaliadas as moscas trans-heterozigotas. Na análise do genótipo heterozigoto *TM3* se obteve resposta estatisticamente significativa somente na maior concentração, indicando que a droga atua via aumento da recombinação mitótica e da mutação.

Os produtos comerciais (adesivos dentais) foram diluídos até que seu diluente – álcool para o **Adesivo A** e acetona para o **Adesivo B** – fosse reduzido a 5% e não atuasse como genotoxina para não servir de viés na obtenção de resultados (RODRIGUES et al., 2007). Como esses produtos foram bastante diluídos, as concentrações testadas podem ser encontradas em situações clínicas, onde o adesivo mal-polimerizado pode liberar grande quantidade de monômeros livres que irão interagir com os tecidos locais, isto é, o complexo dentino-pulpar, mucosa jugal e gengival. Na Tabela 2, se evidencia a potência genotóxica dos dois adesivos por unidade de tratamento. O **Adesivo B** foi cerca de seis vezes (92,60) mais genotóxico que o **A** (16,40). Tais achados podem estar relacionados ao fato de que o **Adesivo B** apresenta maiores concentrações de monômeros, representados por HEMA e UDMA.

Tabela 2 - Quantificação da Recombinação Mitótica e da Potência Genotóxica ^a.

	Marcador Trans-heterozigoto <i>mwh/flr</i> ³			Heterozigoto para inversão <i>mwh/TM3</i>			
	Frequência Padronizada ^b (clones <i>mwh</i> /10 ⁵ cels./ %)	Tamanho médio de clones por classe	Média geométrica do tamanho dos clones ^c	Frequência Padronizada ^b (clones <i>mwh</i> /10 ⁵ céls./ %)	Tamanho médio de clones por classe	Média geométrica do tamanho dos clones ^c	Recombinação (sem correção por tamanho dos clones)
Compostos	(f _t)	($\hat{f}_t$)	(2 ^{h_t-1})	(f _h)	($\hat{f}_h$)	(2 ^{h_h-1})	(1- f _h /f _t) x 100)
Adesivo A	16,40	1,60	51	4,86	0,25	0,42	129,60
Adesivo B	92,60	1,75	1,69	12,14	0,63	0,77	86,90

^aTodos os valores são corrigidos pelo controle. Frequências no marcador heterozigoto *mwh/flr*³ são calculadas com e sem correção por tamanho do clone, uma vez que diferentes estimativas são obtidas para a contribuição relativa da recombinação para a indução de clones totais; ^b A frequência de clones por indivíduos, dividido pelo número de células analisadas por indivíduo (48 800) fornece uma frequência estimada por célula e por divisão celular em experimentos de exposição crônica; ^c Média geométrica calculada de acordo com Frei et al. (1992).

Independente da dose e da potência genotóxica, ambos adesivos se classificam como genotoxinas de ação direta, predominantemente indutoras de recombinação mitótica. A importância clínica dessa afirmação encontra respaldo na utilização desses materiais, que entram em contato direto com tecidos vivos. Os adesivos, que são responsáveis pela adesão da resina composta à estrutura dental durante o protocolo restaurador, são amplamente empregados diariamente por grande parte dos cirurgiões-dentistas, sendo objeto de investigação científica e desenvolvimento tecnológico dentro da Odontologia. Além da ação sobre o dente propriamente dito, monômeros provenientes dos adesivos e das resinas compostas podem exercer sua ação genotóxica sobre as mucosas orais, agindo como um auxiliar na promoção da carcinogênese. Como o câncer bucal é um problema de saúde pública e a população já está exposta a um grande número de substâncias mutagênicas (álcool, fumo, radiação solar, traumas térmicos e mecânicos, além de processos inflamatórios e proliferativos), subprodutos de restaurações estéticas encontram um campo propício ao dano biológico.

Relatos na literatura mostram que os monômeros resinosos possuem diversificada ação citotóxica e genotóxica, entre elas a alteração da secreção de citocinas, do metabolismo lipídico; possuem efeito estrogênico, produzem danos à membrana celular, inibição de atividade enzimática, alteração do equilíbrio REDOX na célula, adutos em DNA e proteínas (reação de adição de Michael), necrose e apoptose celular, formação de micronúcleos, mutação gênica e mutação cromossômica (SCHWEIKL, SPAGNUOLO, SCHMALZ, 2006). Os resultados desta pesquisa apontam para a recombinação mitótica como mais um mecanismo de ação

genotóxica dos monômeros resinosos de uso odontológico, evidenciado nos adesivos. Como a recombinação mitótica é uma importante via de reação genética, envolvida na promoção e evolução do câncer, conhecer substâncias que estimulam esse fenômeno é importante para a utilização segura de materiais em Odontologia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambos adesivos estão relacionados com indução de eventos tóxico-genéticos no genótipo trans-heterozigoto. O **Adesivo A** induz lesões no DNA celular associadas exclusivamente à recombinação entre cromossomos homólogos, enquanto que o **Adesivo B** provoca aproximadamente 14% de danos relacionados à mutação (gênica e cromossômica) e 86% devido à recombinação mitótica.

REFERÊNCIAS

- AROSI, G. A. **Avaliação de microdureza superficial de resinas compostas submetidas a diferentes métodos de polimerização complementar**. 2005. 95 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005
- BAGIS, Y.H.; RUEGGERBERG, F.A. Mass loss in urethane/TEGDMA and BisGMA/TEGDMA based resin composites during post cure heating. **Dental Materials**, v.13, p.377-380, nov. 1997.
- FERRACANE, J.L. Correlation between hardness and degree of conversion during the

setting reaction of unfilled dental restorative resins. **Dental Material Journal**, v.1, p.11-14, 1985.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.297-308, 1998.

GARCIA-BELLIDO, A.; DAPENA, J. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutations in *Drosophila*. **Molecular and General Genetics**, v.128, p.1117-1130, 1974.

GEUTSEN, W. Biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.11, p.333-355, 2000.

KILDAL, K.K.; RUYTER, I.E. How different curing methods affect the degree of conversion of resin-based inlay/onlay materials. **Acta Odontológica Scandinavica**, v.52, p.315-322, 1993.

KLEINSASSER, N. H. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Journal of Dentistry**, v.32, p.229-234, 2004.

LINDSLEY, D.L.; ZIMM, G.G. **The genome of *Drosophila melanogaster***. New York: Academic Press, 1998. 1133p.

PARK, S.H.; LEE, C.S. The difference in degree of conversion between light-cured and additional heat-cured composites. **Operative Dentistry**, v.21, n.5, p.213-217, 1996.

RODRIGUES, F. et al. Genotoxicity of three mouthwashes products, cepacol, periogard and plax, in the *Drosophila* wing-spot test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.48, n.8, p.644-649, oct. 2007.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G.; RACKEBRANDT, K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. **Mutation Research**, v.415, p. 119-130, 1998.

SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G.; SPRUSS, T. The Induction of micronuclei *in vitro* by unpolymerized resin monomers. **Journal of Dental Research**, v.80, n.7, p. 1615-1620, 2001.

SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G.; SCHMALZ, G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. **Journal of Dental Research**, v.85, n.10, p. 870-877, oct. 2006.

WATTS, D.C.; MCNAUGHTON, V.; GRANT, A. A. The development of surface hardness in visible light-cured posterior composites. **Journal of Dentistry**, v. 14, p. 169-174, 1986.