



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENDURECIMENTO NO
COMPORTAMENTO FÍSICO E BIOLÓGICO DE SETE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS**

2014

MONIQUE COSTA MOREIRA FRANÇA

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE ENDURECIMENTO NO
COMPORTAMENTO FÍSICO E BIOLÓGICO DE SETE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

França, Monique Costa Moreira

Influência do tempo de endurecimento no comportamento físico e
biológico de sete cimentos endodônticos / Monique Costa Moreira
França. - São José dos Campos : [s.n.], 2014.
112 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação
em Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.
Orientador: Carlos Henrique Ribeiro Camargo.

1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Adesão. 4. Cimentos. I.
Camargo, Carlos Henrique Ribeiro, orient. II. Instituto de Ciência
e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual
Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita
Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18 de dezembro de 2014
E-mail: monique-costa@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP-Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Dr. Renato Miotto Palo

Faculdade de Odontologia
UNIP-Universidade Paulista
Campus de Campinas

São José dos Campos, 18 de Dezembro de 2014.

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus** por me dar força e serenidade para seguir em frente e ultrapassar todos os obstáculos.

Aos meus pais, **Edmar Moreira e Ana Elizabeth Costa Moreira**, pelo carinho e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim. É por vocês que me dedico e sigo em frente.

Ao meu amado marido, **Fernando Antônio Ebum de Siqueira França**, pelo carinho, paciência e dedicação. Ao meu lado tornou minha caminhada mais suave, sempre me dando forças e compreendendo os momentos de ausência.

Às minhas irmãs, **Amanda, Paloma e Tatiana**, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu querido orientador, **Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pelos ensinamentos e pela compreensão nos momentos mais difíceis pelos quais passei este ano. Muito obrigada pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes da Endodontia: Ana Paula, Bruno das Neves Cavalcanti, Cláudio Antonio Talge Carvalho, Marcia Carneiro Valera Garakis e Frederico Canato Martinho pelos ensinamentos que me foram concedidos.

À minha grande amiga Tânia Mara da Silva, que desde a graduação, nunca me abandonou e que por tantas vezes foi como uma irmã para mim. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

As queridas amigas da pós - graduação pela amizade construída durante o curso de mestrado. Pelo companheirismo de cada uma de vocês.

À querida amiga Rafaela pela grande amizade que firmamos neste período e que sei que continuará para sempre, pela ajuda em todos os momentos alegres e difíceis.

À querida amiga Gleyce, pela ajuda e pelo companheirismo de todos os dias, por me ajudar na estatística, sem a qual este trabalho não poderia ser finalizado.

Obrigada queridas amigas!!!

Aos meus cunhados Christiano Correa Teixeira e Tiago Bosqueiro que me deram apoio seja com palavras ou com ajuda durante todas as fases do mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À todos os funcionários da FOSJC que direta ou indiretamente muito contribuíram em meu trabalho e para o convívio diário.

À Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos - UNESP pelo incentivo durante o desenvolvimento do curso.

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	09
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Teste de citotoxicidade	14
2.2 Teste de genotoxicidade	25
2.3 Resistência adesiva dos cimentos	29
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Ensaio citotoxicidade (XTT)	39
4.1.1 Cultivo das células.....	39
4.1.2 Descongelamento.....	40
4.1.3 Troca de meio.....	42
4.1.4 Subcultura.....	42
4.1.5 Contagem de células.....	43
4.1.6 Plaqueamento.....	45
4.1.7 Levantamento de curva padrão de viabilidade celular.....	46
4.1.8 Preparo dos extratos originais.....	46
4.1.9 Condicionamento do meio de cultivo.....	49
4.1.10 Diluições.....	49

4.1.11 Avaliação da viabilidade e crescimento celular.....	51
4.2 Ensaio de micronúcleo(MNT).....	53
4.3 Ensaio de “push-out”.....	56
4.3.1 Preparo dos dentes.....	56
4.3.2 Obtenção dos espécimes.....	58
4.3.3 Ensaio mecânico.....	60
4.4 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 Teste de citotoxicidade (XTT).....	64
5.2 Teste de genotoxicidade (MNT).....	72
5.2.1 Apoptose.....	76
5.2.2 Mitose.....	78
5.3 Teste de “push-out”.....	80
6 DISCUSSÃO.....	83
6.1 Discussão da metodologia.....	83
6.2 Discussão dos resultados.....	88
7 CONCLUSÃO.....	96
8 REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS.....	107

França MCM. Influência do tempo de endurecimento no comportamento físico e biológico de sete cimentos endodônticos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de endurecimento sobre as propriedades físicas (teste de push-out) e biológicas (XTT, MNT) de sete cimentos endodônticos: Apexit Plus, Real Seal, Endo Rez, Roeko Seal, AH Plus, Endomethasone N e o cimento biocerâmico iRoot SP. **Material e Métodos:** Para a análise da citotoxicidade (XTT), foram utilizados fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDLF). Para o número de micronúcleos (MNT), este estudo avaliou culturas de células expostas a diluições dos cimentos testados sobre células V79 No teste de push-out foram usados cento e quarenta dentes humanos unirradiculares que tiveram suas coroas removidas. Os canais radiculares foram preparados biomecanicamente com o sistema rotatório Mtwo (VDW GmbH, München, Alemanha) até o número de série 702 a 25 mm (25-40). Durante todo o preparo biomecânico, os canais foram irrigados com 2 ml de hipoclorito de sódio. Os espécimes foram seccionados em fatias de 2 mm nos terços cervical, médio e apical. O teste de Push-out foi realizado a uma velocidade de 1 mm / min e célula de carga de 50 Kgf. Os testes biológicos foram avaliadas após 24 h, 72 h, 1 semana, 1 mês, 3 meses, 6 meses e um ano após a manipulação e o teste de push-out 15 dias e 1 ano. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn ($p = 0,05$). **Resultados:** IRoooot SP, Roeko seal, Apexit Plus, AH Plus e Real Seal não mostraram citotoxicidade nas células PDLF. AH Plus, Real Seal, IRoooot SP e Endomethasone N não apresentaram genotoxicidade. Roeko Seal e Apexit Plus mostraram ser genotóxico e EndoRez apresentou alta genotoxicidade. Roeko Seal, IRoooot SP e EndoRez tiveram menor resistência à tração nos terços apical, médio e cervical, tanto em 15 dias e 1 ano de análise. Além disso, Endomethasone N, Real Seal e AH Plus apresentaram uma força de adesão satisfatória após 1 ano em todos os terços. **Conclusão:** Conclui-se que AH Plus e Real Seal foram os cimentos com menor citotoxicidade e genotoxicidade, com bons valores de resistência de união em todos terços, mantendo como o material de escolha para a terapia endodôntica.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Genotoxicidade. Adesão. Cimentos.

França MCM. Setting time of influence on the physical and biological behavior seven sealers [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the influence of curing time on physical (push-out test) and biological properties (XTT, MNT) of seven sealers: Apexit Plus, Royal Seal, Endo Rez, Roeko Seal, AH Plus, Endomethasone, and bioceramic cement iRoot SP. **Material and Methods:** To the cytotoxicity analysis (XTT), fibroblasts of the human periodontal ligament were used (PDLF). To the number of micronuclei (MNT), this study evaluated cell cultures exposed to dilutions of the tested sealers, among them from causing excessive cytotoxic effects on V79 cells. To push-out test was used one hundred and forty single-rooted teeth which had the crowns removed. The root canals were prepared biomechanically with the rotary system Mtwo (VDW GmbH, München, Alemanha) until to series number 702 to file 25 mm (25-40). Throughout the biomechanical preparation, the canals were irrigated with 2 ml of sodium hypochlorite. The specimens were sectioned in slices of 2 mm in cervical, middle and apical. The push-out test was performed at speed of 1 mm/min and 50 kgf load cell. The tests were evaluated after 24 h, 72 h, 1 week, 1 month, 3 months, 6 months and one year after manipulation. Data were analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn test ($p = 0.05$). **Results:** IRoot SP, Roeko Seal, Apexit Plus, AH plus and Real Seal showed no cytotoxicity in PDLF cells. AH plus, Real Seal, IRoot SP and Endomethasone N showed no genotoxicity. Roeko Seal and Apexit Plus have shown to be genotoxic and EndoRez showed high genotoxicity. Roeko Seal, IRoot SP and EndoRez had lower bond strength in the apical, middle and cervical thirds in both the 15-day and 1 year analysis. Apexit Plus, Endomethasone N, Real Seal and AH plus had a satisfactory bond strength after 1 year in all thirds. **Conclusion:** It is conclude that AH plus and Real Seal were the sealer with lower cytotoxicity and genotoxicity, with good values of bond strength in all third, keeping as the material of choice for endodontic therapy.

Keywords: Cytotoxicity. Genotoxicity. Adhesion. Sealer

1 INTRODUÇÃO

Obturar tridimensionalmente o canal radicular é essencial para prevenir sua contaminação e preservar a integridade dos tecidos periapicais, assegurando o sucesso do tratamento endodôntico (Leonardo et al., 2005). Essa obturação cria uma interface única e complexa entre o material obturador e o tecido periapical, uma vez que, os cimentos obturadores de canais radiculares permanecem em íntimo contato com diversas células presentes no periápice (Murphy, 1998).

Contudo, esses mesmos cimentos quando em contato com os tecidos perirradiculares podem acarretar irritação tecidual ou causar atraso no processo de cicatrização ou reparação. Esses riscos aumentam quando os cimentos não possuem propriedades físicas e biológicas apropriadas ou quando não impermeabilizam efetivamente o sistema de canais radiculares quanto ao ingresso de bactérias e de seus subprodutos (Waltimo et al., 2001).

Atualmente nenhum dos materiais disponíveis no mercado satisfaz completamente os requisitos de um cimento endodôntico ideal. A busca atual têm sido desenvolver cimentos obturadores que mantenham e/ou melhorem as propriedades físicas dos cimentos tradicionais e que acima de tudo sejam mais biocompatíveis (Tay et al., 2007), ou que apenas promovam uma alteração inflamatória não intensa e obrigatoriamente transitória. Avanços tecnológicos na adesividade dos novos cimentos endodônticos têm reduzido diretamente a infiltração apical e coronária pela adesão dos materiais obturadores às paredes do canal radicular, criando uma estrutura em “monobloco” e teoricamente menos permeável (Tay et al., 2007). Cimentos resinosos

à base de metacrilato têm sido desenvolvidos entre outras razões com esta proposta (Kim et al., 2010).

O cimento de presa dual à base de resina de metacrilato Real Seal (SybronEndo, Orange, CA, Estados Unidos), foi introduzido para substituir os cimentos convencionais. Sua matriz é composta por uma mistura de uretano dimetacrilato (UDMA), polietileno dimetacrilato, bisfenolA-glicidildimetacrilato (BisGMA), sulfato de bário, sílica, hidróxido de cálcio, óxido de bismuto, fotoiniciadores e por pigmentos (Versiani et al., 2006). Ainda não existem pesquisas que avaliam sua biocompatibilidade por longos períodos.

Outro cimento endodôntico também à base de metacrilato e de presa dual, o EndoREZ (Ultradent Products Inc, Utah, Estados Unidos), é radiopaco e hidrofílico, o que permite seu uso em ambientes úmidos; além de possuir boa fluidez e adaptação às paredes do canal radicular (Zmener et al., 2008). Ainda possui uma eficiente penetração nos túbulos dentinários e uma excelente adaptação nas paredes do canal radicular. É recomendado para o uso com qualquer tipo de cone de guta- percha (Kim et al., 2010).

Recentemente com os avanços dos cimentos obturadores juntamente com o desenvolvimento da nanotecnologia promoveram a introdução dos cimentos biocerâmicos na endodontia, e esta conquista atualmente é considerada um divisor de águas na obturação dos canais radiculares. O cimento biocerâmico, recém introduzido no mercado, iRoot SP (Bioceramix Inovador, Vancouver, Canadá) é um cimento pré-misturado com sistema injetável. Composto de fosfato de cálcio, hidróxido de cálcio, silicato de cálcio, óxido de zircônio que confere radiopacidade, agentes, e espessantes. Uma de suas vantagens é a sua capacidade para formar hidroxiapatita durante o processo de endurecimento, além de proporcionar adesividade entre a parede dentinária e o cimento (Zhang et al., 2010). Exige a presença de água para seu endurecimento e não exige nenhum agente adicional ou de

mistura para que seja um produto homogêneo e consistente para o preenchimento de canais radiculares com ou sem guta- percha. Apresenta uma composição semelhante ao MTA (Mineral trióxido agregado branco) (Zhang et al., 2010).

O cimento endodôntico à base de silicone Roeko Seal (Roeko Dental Products, Langenau, Alemanha) é um preparado à base de poli- dimetilsiloxano utilizado para selar canais radiculares. As suas propriedades físicas e químicas proporcionam-lhe uma grande hermeticidade e biocompatibilidade. Composto por polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óleo à base de parafina, catalisador de platina, dióxido de zircônio foi desenvolvido com o intuito de se obter um material inerte aos tecidos apicais. Estudos realizados em cães demonstraram que este material é dimensionalmente estável e dotado de alta capacidade seladora prevenindo a infiltração bacteriana por período prolongado (Wu et al., 2006).

O cimento AH Plus (Dentsply, Constança, Alemanha) à base de resina epóxica possui adequadas propriedades físico-químicas como alta fluidez e tempo de presa prolongado, possibilitando que o cimento seja capaz de penetrar nas microirregularidades do sistema de canais radiculares. O emaranhado formado pelo cimento e pelos túbulos dentinários aliado a coesão existente entre as moléculas do cimento aumenta a resistência à remoção e o deslocamento da superfície da dentina, conferindo alta adesão ao material (Souza-Neto et al., 2002, 2005).

A adição de hidróxido de cálcio aos cimentos endodônticos tem como objetivo melhorar as propriedades biológicas desses materiais. O cimento Apexit Plus (Ivoclar Vivadent, Schaan, Listenstaina) foi desenvolvido e embasado nesta teoria. Este é composto por hidróxido de cálcio, óxido de zinco, fosfato de cálcio, dióxido de silicone, ésteres de silicato e bismuto. Apresentando bom escoamento, o que lhe permite boa adaptação às paredes do canal radicular, além disso,

uma ligeira expansão de presa em combinação com uma baixa solubilidade, proporciona também um bom selamento ao canal radicular (Salz et al., 2009).

Cimentos a base de óxido de zinco e eugenol têm sido comumente utilizados em Endodontia há várias décadas. O cimento Endomethasone N (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França), possui elevada atividade antibacteriana (Pumarola et al., 1992), entretanto, sua utilização é ainda bastante controversa, pelo fato de haver formaldeído em sua composição (Kaufman, Rosenberg, 1980), o que lhe confere alta citotoxicidade (Ersev et al., 1999). Contudo em sua nova formulação é informado que este não libera mais formaldeído. Desta forma, pesquisas que avaliam o poder citotóxico deste cimento após longos períodos de presa ainda são necessárias.

Devido à procura por um material com características adequadas tanto físicas quanto biológicas, este estudo teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade dos sete tipos de cimentos endodônticos por meio de ensaios de citotoxicidade (teste de XTT) e de genotoxicidade (ensaio de micronúcleos) e verificar as propriedades mecânicas por meio do teste de push-out, nos diferentes terços radiculares e por diferentes períodos de avaliação.

A hipótese de nulidade deste estudo foram (I) os cimentos endodônticos à base de resina e de óxido de zinco e eugenol possuírem maior potencial citotóxico e genotóxico, sobre as células PDLF e V79, respectivamente, do que os cimentos à base de silicone, biocerâmico e de hidróxido de cálcio (II) as propriedades mecânicas dos cimentos avaliados não diferenciariam entre si, apesar das diferenças na composição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os textos presentes nesta revisão foram divididos em tópicos principais: Teste de citotoxicidade, Teste de genotoxicidade e Resistência adesiva dos cimentos, para que seja mais didática a análise dos textos e para melhor compreensão do tema.

2.1 Teste de citotoxicidade

A biocompatibilidade é um importante fator a ser estudado, bem como as características físicas e químicas na seleção de materiais para a terapia endodôntica, devido ao contato direto dos materiais com o tecido periapical (Scelza et al., 2011). Os cimentos endodônticos podem ultrapassar o forame apical e permanecer em íntimo contato com o tecido periapical por um período prolongado, então a biocompatibilidade destes cimentos é muito importante para a cicatrização da lesão periapical (Willershausen et al., 2000; Huang FM et al., 2002).

A relevância da avaliação biológica pode ser medida pela existência de várias normas internacionais dedicadas ao assunto (American Society for Testing and Materials (ASTM), 2007; International Organization for Standardization, 2008, 2009). A International Organization for Standardization (ISO) determina que a avaliação de compatibilidade de tecido, tanto *in vitro* como *in vivo*, quando aplicável, devem ser realizados como passos críticos, antes da aplicação do material clínico (ISO 7405:2008). Neste contexto, testes de citotoxicidade *in vitro* permitem o emprego de tipos e linhagens celulares

relevantes, usando condições simples, controladas e reproduzíveis deste teste, e em conformidade com os princípios da bioética (International Organization for Standardization, 2009).

Atualmente, os riscos biológicos dos cimentos endodônticos são avaliados, em parte, através de testes de citotoxicidade *in vitro*. Os ensaios *in vitro*, normalmente avaliam um material durante 24 h até várias semanas (Hanks et al., 1996; Bouillaguet et al., 2006; Brackett et al., 2008), e vários estudos sugerem que os materiais têm diferentes graus de toxicidade inicial em função da condição do teste (Bouillaguet et al., 2006; Geurtsen, Leyhausen, 1997; Lodiene et al., 2008; Eldeniz et al., 2007; Huang TH et al., 2002; Miletic et al., 2005). Uma das principais limitações dos atuais testes *in vitro* é que os testes de curto prazo podem ser pouco representativos do desempenho a longo prazo *in vivo*. Por isso, foram feitos esforços para aumentar a duração dos testes mas sem modificá-los de modo que eles possam ser mais relevantes clinicamente (Brackett et al., 2009, 2010; Schwarze et al., 2002b; Camps, About, 2003).

Na literatura não há dados suficientes que assegurem o uso dos novos cimentos obturadores de canais radiculares. Estudos *in vivo* que avaliam a longo prazo a ação desses cimentos são as metodologias ideais para determinar a atuação clínica desses novos materiais. Porém não são estudos comuns relatados na literatura, além disso, são práticas de difícil execução, onerosas, que apresentam limitações sociais e que exigem tempo demasiado para realização. Essas limitações têm nos dirigidos para a opção e execução de testes *in vitro* que avaliam os riscos biológicos desses novos materiais. Ensaio realizados em laboratórios são mais rápidos, menos dispendiosos, porém têm sido criticados por possuírem baixa relevância clínica. Pesquisas *in vitro* que avaliam a biocompatibilidade de cimentos obturadores em curto prazo (< 72 h), sugerem que esses materiais possuem variados graus de citotoxicidade inicial dependendo das condições experimentais. Desse

modo a principal limitação dos estudos *in vitro* contemporâneos é que a avaliação em curto prazo é inadequada para obtenção de respostas biológicas desses materiais que permanecem em contato direto com os tecidos perirradiculares por meses ou até anos

Recentemente, algumas pesquisas *in vitro* têm expandido os intervalos de tempos avaliados a fim de melhor simular as condições clínicas, por meio do prolongamento do tempo de endurecimento dos cimentos. Os resultados desses estudos mostraram que muitos cimentos endodônticos permaneceram severamente citotóxicos por 5-6 semanas após sua espatulação. Contudo as mesmas respostas em longo prazo de outros materiais ainda não são conhecidas, somado a isso muitas vezes esses estudos freqüentemente não utilizam linhagem celulares encontradas no periápice.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para analisar viabilidade ou sobrevivência celular são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas de materiais dentários, por ser uma análise de menor custo e de maior reprodutibilidade em relação aos testes realizados em animais (Camps, About, 2003; Souza et al., 2006). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagem a facilidade no controle dos fatores experimentais envolvidos que são freqüentemente causas de falhas nos experimentos *in vivo* (Camps, About, 2003; Scelza et al., 2012).

O método de avaliação da toxicidade pelo uso do corante XTT 2,3 - bis (2-metoxi-4nitro-5-sulfofenil) - 5 (fenilamnocarboniltetrazolium) é extremamente confiável, rápido e facilmente reproduzível, refletindo não somente o número de células em uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, pois baseia-se na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase (Schwarze et al., 2002a, 2002b).

Lodiene et al. (2008), avaliaram a toxicidade de cimentos endodônticos a base de resina epóxi (AH plus) e a base de silicone (Roeko Seal) com cimentos a base de metacrilato (EndoREZ e Epiphany /Real

Seal), através dos testes de MTT e do Teste de difusão em filtro. Os extratos dos cimentos foram colocados em contato com cultura de células de fibroblastos de rato (L929) e a viabilidade celular e o número de células foram medidos utilizando o método de exclusão do azul de typan e da câmara de contagem de Burke. As amostras dos cimentos foram preparadas em anéis de plástico não reativos (5 mm de diâmetro) e colocadas em contato com as monocamadas de células imediatamente após a mistura (estado a fresco). Os materiais de presa dual foram preparados sem luz e com fotopolimerização induzida durante 40 s. Numa segunda etapa as amostras ficaram em repouso por 24 h a 37 °C e 100% de umidade (estado de endurecimento). O EndoREZ não apresentou endurecimento completo mesmo após 24 h e após a utilização de polimerização extra. Durante o teste de difusão as células foram cultivadas por 48 h em filtro de acetato-celulose em todos de cultura e as amostras foram colocadas diretamente sobre os filtros. Discos de PTFE (polytetrafluoroethylene) serviram de controle negativo e filtros de celulose com 35 µL de fenol 4% como controle positivo. Após 2 h de incubação as amostras foram removidas dos filtros e as células foram coradas com tetrazolium para demonstrar a atividade da succinato desidrogenase em células viáveis. As amostras de Roeko Seal e Epiphany foram testadas em triplicata, enquanto AH plus e EndoREZ em duplicata. O AH plus foi citotóxico quando testado imediatamente após endurecimento mas não após 24 h, enquanto EndoREZ e Roeko Seal não apresentaram qualquer citotoxicidade nos tempos 0 h e 24 h. Já o Epiphany foi severamente citotóxico em 0h e moderadamente após 24 h. No teste do MTT os cimentos AH plus e Roeko Seal foram classificados ligeiramente citotóxicos, o EndoREZ não citotóxico enquanto o Epiphany foi severamente citotóxico.

Zhang et al. (2010), estudaram o efeito de um novo cimento endodôntico o iRoot SP (Innovative Biocreamix Inc, Vancouver, Canada) comparado com o AH plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) sobre a expressão de genes relacionados com a mineralização de osteoblastos

MG63. Foram preparados espécimes (5 mm de diâmetro e 2 mm de altura) de iRoot SP e AH Plus e sobre eles colocados 5ml de meio de cultura. Após as células MG63 foram expostas a várias diluições (1/1, 1/2 e 1/4) dos extratos. A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio ensaio de brometo de MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade não específica dos materiais dentários. A expressão de genes relacionados com a mineralização, incluindo colagénio do tipo I (COL I), osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN), foi detectada nos dias 1, 3 e 6, por uma reação cadeia polimerase em tempo real. Um ensaio imunoenzimático ligado à enzima foi utilizada para avaliar alterações protéicas COL I e BSP. No ensaio de MTT, os extratos não diluídos de iRoot SP não foram citotóxicos, enquanto que os extratos não diluídos de AH Plus foram classificados como ligeiramente citotóxico. O iRoot SP regulou COL I, OCN, e BSP na expressão do RNA mensageiro após 3 e 6 dias. No experimento ensaio imunoenzimático ligado a enzimas, o iRoot SP aumentou COL I e os níveis de proteína BSP em comparação com AH Plus e o grupo controle no sexto dia. Com base nestes resultados, iRoot SP pode ser considerado como um material favorável a interação com o material celular.

Brackett et al. (2010), avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de cinco cimentos endodônticos durante 12 semanas usando três linhagens de células: fibroblastos de rato L929, células osteoblásticas de rato (ROS) 17/2.8, e osteoblastos de rato MC3T3-E1. Foram elaborados discos (n = 6) de AH-plus (AHP), duas versões de Endo Rez (ER, eRx), Epifania (EPH) e Pulp Canal Sealer (PCS). Os cimentos e o Teflon (Tf, controle negativo) foram colocados em contato direto com as células após a imersão em tampão de fosfato. O teste de citotoxicidade foi realizado após o período inicial 72 h (semana 0) e depois de 1, 4, 6, 8, e 12 semanas para o L929 e de 4 e 8 semanas para o ROS 17/2.8 e MC3T3-E1. A atividade do Succinato celular desidrogenase (SDH) foi estimada utilizando o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, um

tetrazolium amarelo), e as atividades foram normalizadas para o controle de Teflon ®. As respostas celulares aos materiais foram comparadas por meio da análise de variância e após o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Inicialmente, todos os cimentos suprimiram a atividade SDH de fibroblastos L929. Depois de 12 semanas de imersão em solução salina, AHP exibiu a atividade SDH acima de Tf (120%), seguido por Rx (78%), ER (58%), PCS (38%), e EPH (28%), todos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Em geral, as três linhas celulares responderam de forma semelhante para os cimentos. No entanto, AHP causou respostas únicas: células ROS foram inicialmente menos sensível, e AHP foi severamente citotóxica para células MC3T3 ($< 35\%$ de Tf) ao longo de 8 semanas. Os dados sugerem que o "envelhecimento", em solução salina, dos cimentos endodônticos atuais diminuem a citotoxicidade destes em diferentes períodos.

Mukhtar-Fayyad (2011), comparou a citotoxicidade de dois materiais à base de biocerâmica, BioAggregate e iRoot, em células de fibroblastos humanos MRC-5. Foram fabricados vinte e quatro discos dos materiais BioAggregate e iRoot SP (5 mm de diâmetro e 2 mm de altura). Após o endurecimento, os discos foram esterelizados com óxido de etileno e luz ultravioleta por 2 h. Depois foram imersos em meio de cultura de células a 37 °C durante 5 dias, e os extratos obtidos foram diluídas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco para atingir 5 concentrações (puro, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100). As Células de fibroblastos humanos foram incubados com cada diluição do extrato durante 24 h, 72 h, e 7 dias, e em seguida, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de MTT. As diferenças nos valores médios de viabilidade celular entre os materiais foram avaliadas utilizando o 1-way ANOVA e teste de Tukey. Notaram que houve diferença estatística significativa entre os materiais experimentais e o grupo controle e entre os dois materiais nos, 1/2 e 1/10 concentrações para os três períodos de incubação. O efeito citotóxico de ambos os materiais foi dependente da concentração. Assim,

BioAggregate e iRoot SP apresentam uma biocompatibilidade aceitável.

Karapınar-Kazandag et al. (2011), investigaram a citotoxicidade de cinco cimentos endodônticos: AH Plus (Dentsply De Trey GmbH, Constança, Alemanha), RoekoSeal (Coltène Whaledent, Langenau, Alemanha), EndoREZ (Ultradent Products Inc., Sul da Jordânia, Utha, EUA), Epiphany (Pentron Technologies clínicos, LLCC, Wallingford, CT, EUA) e Activ GP (Brasseller Inc., EUA, Savannah, GA, EUA) sobre fibroblastos de rato L929 e células pulpares humanas primárias. Foram confeccionados espécimes cilíndricos (4 mm de diâmetro e 3 mm de altura) e mantidos a 37 °C numa atmosfera umidificada de 5% de CO₂ durante três vezes o comprimento de tempo de endurecimento determinado pelo fabricante. Os extratos das amostras foram realizados colocando 2,5 ml de meio de crescimento de células sobre os espécimes nos tempos 1, 4 e 7 dias. Após foi realizada a filtração dos extratos e diluídos em 50% e 25%. Os extratos diluídos foram incubados com as células cultivadas durante 24 h e 72 h. A citotoxicidade foi avaliada usando o ensaio colorimétrico MTS. Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn para comparar os extratos diluído/não diluído em termos de viabilidade celular (% do controle). Foram realizados testes de Friedman e teste de comparação múltipla de Dunn após comparar períodos de análise. Teste de Wilcoxon foi utilizado na comparação da leitura de 24 h e 72 h. O extrato não diluído de 1 dia do Activ GP foi significativamente mais citotóxico do que todos os outros cimentos. Os Extratos não diluídos de 4 e 7 dias de Epiphany e Activ GP foram mais citotóxicos do que os outros três cimentos. Extratos diluídos de Activ GP e Epiphany eram geralmente menos tóxico do que os não diluídos. A citotoxicidade do Epiphany aumentou significativamente quanto maior o tempo de exposição das células. Nenhuma ou mínima citotoxicidade foi observada com RoekoSeal, AH Plus e EndoREZ. Os cimentos exibiram vários graus de citotoxicidade dependente de sua composição química.

Yilmaz et al. (2012), avaliaram os efeitos citotóxicos de diferentes cimentos endodônticos comercialmente disponíveis no mercado, Sealite Ultra (SU), Tubli-Seal (TS), Tubli-Seal EWT (TS-EWT), Pulp Canal Sealer (PCS), Pulp Canal Sealer EWT (PCS-EWT), Endomethasone N (En N), e o Apexit Plus (AP) em cultura de células de fibroblastos de rato L929 (ATCC) usando o ensaio MTT. Os extratos dos cimentos foram mantidos em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ durante 1 h. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando as diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) dos extratos dos cimentos. No ensaio do MTT, 5 mg / ml do MTT em solução salina foi adicionado a cada poço ficando em incubadora a 37 °C durante 4 h. O precipitado de formazan foi dissolvido num tampão contendo 23% de sulfato de sódio de dodecilo e 50% de N, N-dimetilformamida (pH 4,7). Densidades ópticas de formazan dissolvidos foram lidas em espectrofotômetro de microplacas. AP, TS e TS-EWT não mostraram citotoxicidade em qualquer diluição testada. Outros cimentos exibiram algum grau de citotoxicidade nas diluições 1:4 e 1:2. Em SU, PCS e EnN houve efeito citotóxico na diluição de 1:4 e confirmada em 1:2. PCS-EWT e SU demonstraram uma maior citotoxicidade em 1/2 de diluição do que os outros cimentos. Nas diluições de 1/8 a 1/32 nenhum cimento demonstrou citotoxicidade.

Brackett et al. (2012), avaliaram *in vitro* a resposta citotóxica dos cimentos endodônticos durante um ano. AH Plus (AHP), Epiphany (EPH), EndoREZ (ER), GuttaFlow (GF), InnoEndo (IN), e Pulp Canal Sealer (PCS) foram expostos a osteoblastos de rato e monócitos humanos após a sua presa. Teflon(TF) foi utilizado como controle negativo. Foram confeccionadas 72 amostras e colocadas numa solução estéril de saliva artificial durante 52 semanas para simular o envelhecimento *in vivo*. Após 1 ano as amostras foram colocadas em contato direto com células osteoblásticas MC3T3-E1(ATT-CRL 2593, subclone 4) de rato e monócitos humanos THP1(ATCC TIB 202, Tipo cultura americana Collection, Rockville, MD) por 72 h e a citotoxicidade

foi testada pelo ensaio de MTT. A resposta celular foi estimada pela atividade do succinato desidrogenase (SDH). O efeito dos materiais de TNF α a partir de secreção ativada (LPS) e monócitos inativados também foi medido. Antes do envelhecimento, todos os materiais, exceto GF tiveram a atividade SDH suprimida quando comparado com o controle. A atividade SDH em células expostas a alguns cimentos melhorou significativamente após 1 ano, mas o ER permaneceu citotóxico. Quando os materiais após 1 ano foram novamente testados, AHP, ER, GF, e IN não apresentaram mudanças. EPH e PCS foram mais tóxicos. Os monócitos responderam de forma semelhante a que os osteoblastos. Nos cimentos endodônticos a atividade de secreção dos monócitos TNF α ativados por LPS expostos a AHP e EM suprimiram significativamente a secreção de TNF α . Quando os monócitos ativados foram expostos aos cimentos, uma diferencial supressão da secreção de TNF α foi observado para três dos quatro cimentos testados (EPH, IN, e PCS). Os resultados sugerem que o envelhecimento a longo prazo pode ser um complemento útil para a avaliação *in vitro* destes materiais.

Ashraf et al. (2012), avaliaram a citotoxicidade de três cimentos à base de resina, ou seja, AH Plus, EndoREZ e Epiphany em células L929. Os cimentos foram divididos em dois grupos, puro e diluído. As diluições dos materiais foram preparadas separadamente e foram incubados com fibroblastos L929, nos períodos de 1 h, 24 h e 72 h. Pulp Canal Sealer e Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) serviram como controles positivo e negativo, respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT ([3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)] -2,5-difenil brometo de succinato), após 1 h, 24 h e 72 h. Os autores evidenciaram que após 1 h, o Epiphany e o AH plus puros foram significativamente mais citotóxicos do que suas amostras diluídas. Nenhuma diferença significativa foi percebida entre a citotoxicidade dos cimentos no seu estado puro e o controle positivo, ou entre eles e o controle negativo. Após 24 h, todos os materiais foram significativamente mais citotóxicos do que o grupo

controle negativo, e foram menos citotóxicos do que o grupo controle positivo. Após 72 h, as amostras puras e as diluições de todos os materiais foram tão citotóxicas quanto o grupo controle positivo. Em cada momento, nenhuma diferença significativa foi percebida entre os diferentes materiais em termos de viabilidade celular. Portanto, concluíram que as diferenças observadas entre a citotoxicidade de AH Plus, EndoREZ e Epiphany não atingiram um nível significativo nos períodos comparados.

Scelza et al. (2012), compararam a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos (Sealapex, Pulp Canal Sealer EWT, ReaSeal e MTA Fillapex) 1 e 7 dias após a preparação dos extratos, quando foram avaliados através de uma análise multiparamétrica empregando células primárias humanas intimamente relacionadas aos tecidos periapicais. Os extratos de cada cimento foram preparados e expostos por 24 h aos meios de cultura, e a cada 24 h até 7 dias após a mistura. Osteoblastos primários humanos foram expostos aos extratos durante 24 h, a 37 °C com 5% de CO₂, e a viabilidade celular foi avaliada por um ensaio de multiparamétrico sequencialmente, nas mesmas células, analisando a atividade mitocondrial (XTT), a integridade da membrana (teste vermelho neutro) e densidade total de células (teste de exclusão de corante cristal violeta). Os resultados de cada teste e o tempo foram comparadas por análise de duas variâncias (ANOVA). Assim, todos os cimentos endodônticos tiveram forte citotoxicidade em 24 h. Em um período mais longo (7 dias), a viabilidade para Sealapex teve um aumento significativo ($p < 0,05$) e Pulp Canal Sealer alcançou níveis de citocompatibilidade semelhantes aos do grupo controle. A análise de variância indicou uma correlação geral entre a citotoxicidade dos materiais e o tempo após a mistura, com algum grau de dependência no ensaio de viabilidade celular. Todos os materiais tinham altos níveis citotóxicos para células primárias humanas, e em sua maioria de forma dependente do tempo, como mostrado por três diferentes testes de viabilidade celular.

Mutoh et al. (2013), avaliaram a biocompatibilidade de

cimentos endodônticos à base de resina (RCSs) nos tecidos periapicais de ratos. Os ratos foram submetidos a reimplante dentário para reproduzir a resposta dos tecidos periapicais com RCSs. Foram utilizados o cimento resinoso Epiphany SE TM, AH Plus Jet TM, o cimento à base de eugenol (Canals) e um grupo de controle. O primeiro molar superior direito foi extraído e no seu ápice foi aplicado o RCSs, e, em seguida, o dente foi reposicionado. A avaliação histológica demonstrou que uma inflamação leve ocorreu no tecido periapical com Epiphany e AH Plus Jet no sétimo dia, enquanto o cimento Canals induziu uma inflamação severa a moderada. As análises estatísticas demonstraram que foram observadas diferenças significativas entre o cimento Canals e os outros grupos no dia 7 sobre a resposta inflamatória. No dia 14, as lesões induzidas por todos os selantes foram curadas e predominantemente substituído por tecido conjuntivo fibroso. Os resultados sugerem que Epiphany SE e AH Plus Jet são bons materiais biocompatíveis.

Silva EJNL et al. (2013), investigou os efeitos de oito cimentos endodônticos sobre a citotoxicidade de células de fibroblastos Balb/c 3T3 durante 5 semanas. Utilizaram os cimentos AH plus, Epiphany, Endomethasone N, EndoREZ, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer EWT, Roeko Seal e Sealapex. Foram fabricados nove discos de cada cimento (5 mm de diâmetro e 2 mm de altura) e a citotoxicidade dos cimentos foram avaliadas no período logo após a mistura, e depois de 1, 2, 3, 4, e 5 semanas para estudar a influência do tempo de endurecimento dos cimentos na sua toxicidade. A viabilidade celular foi determinada em cada semana (1-5 semanas) através do ensaio de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio. Cristais de formazan foram produzidos dentro das células através da redução da succinato desidrogenase. Os autores verificaram que Roeko Seal foi o único cimento que não demonstrou quaisquer efeitos citotóxicos em qualquer tempo. Todos os outros cimentos exibiram toxicidade grave inicialmente (semana 0). O MTA Fillapex permaneceu moderadamente citotóxico após o término do período

experimental. A toxicidade dos outros cimentos testados diminuiu gradualmente ao longo do tempo. Os cimentos endodônticos avaliados apresentaram diferentes graus de toxicidade, principalmente no estado puro. Portanto, RoekoSeal teve nenhum efeito citotóxico, e o MTA Fillapex foi significativamente associado com menor viabilidade celular quando comparado com os outros cimentos endodônticos testados.

2.2 Teste de genotoxicidade

Na literatura as pesquisas estão muito focadas em avaliações citotóxicas, enquanto poucos são os dados publicados quanto ao potencial genotóxico dos cimentos endodônticos, uma vez que a genotoxicidade pode ser um fator importante de influência na biocompatibilidade desses materiais (Tai et al., 2002; Brzovic et al., 2009).

Os testes de genotoxicidade são testes *in vitro* designados para detectar materiais ou seus componentes que induzem danos ao material genético das células, tais como quebra cromossômica, quebra de DNA e alteração na capacidade de reparo no DNA celular (Ribeiro et al., 2006a). Nas últimas décadas os testes de genotoxicidade têm alcançado ampla aceitação como indicador carcinogênico, pois danos ao genoma das células podem diminuir significativamente a capacidade de auto reparação tecidual ou em longo prazo causar o desenvolvimento de neoplasias (Brzovic et al., 2009).

Os testes de genotoxicidade são importantes na pesquisa e avaliação do potencial carcinogênico que alguns componentes desses cimentos possam apresentar (Chang et al., 1998; Ribeiro et al., 2005, 2008). Embora existam muitos testes de genotoxicidade *in vitro*, os mais utilizados são o teste de células individualizadas em gel de agarose (ou teste do cometa) (Ribeiro et al., 2004, 2006c) e o teste de micronúcleo

(Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

O teste do cometa detecta a quebra do DNA celular permitindo mensurar o dano causado sobre o material genético. O princípio básico deste teste é a migração do DNA sobre a matriz de agarose em condições de eletroforese. No microscópio de fluorescência, as células danificadas assemelham-se a um cometa, com uma cabeça (região do núcleo) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que estão fora do núcleo (Ribeiro et al., 2006c).

O teste de micronúcleo (MNT) é utilizado para detecção de mutações cromossômicas. Utilizado para análise da genotoxicidade de materiais, é capaz de detectar aberrações ou mutações cromossômicas, em células de organismos expostos a substâncias com potencial de mutagenicidade. Assim, atuam como marcadores biológicos de danos genéticos e podem ser utilizados como indicadores de mutagenicidade, pois fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiramente isolados levam a formação de micronúcleos durante a mitose do ciclo celular (Schweikl, Schmalz, 2000).

O potencial genotóxico dos cimentos à base de resina e à base de metacrilato de epóxi tem levantado alguma preocupação (Brzovic et al., 2009). Ambos os tipos de cimento são frequentemente utilizados clinicamente devido à sua melhor solubilidade e bom resultado do tratamento (Poggio et al., 2010). Cimentos de resina epóxi podem liberar pequenas quantidades de bisfenol A éter diglicidil e formaldeído, que são considerados cancerígenos (Camargo et al., 2009). Além disso, pesquisas anteriores utilizando o teste de micronúcleo (Camargo et al., 2009) já apontaram que a mutagenicidade de selantes à base de resina epóxi é pequena. No entanto, não há consenso na literatura, pois outros pesquisadores não puderam encontrar danos no DNA (Huang TH et al., 2004; Ribeiro, 2008).

Schweikl e Schmalz (2000) avaliaram a citotoxicidade e a indução de micronúcleos em células V79 do cimento endodôntico AH

plus. O AH Plus foi testado imediatamente após a preparação e após um tempo de presa de 24 h. Os materiais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e em solução salina fisiológica durante 24 h. As amostras diluídas em DMSO claramente reduziram a viabilidade das células V79, mas as diluídas com soro fisiológico foram pelo menos 10-100 vezes menos tóxicas. Da mesma forma, as amostras do AH Plus foram mutagênicas em uma maneira dose- dependente em células V79 após diluição em dimetilsulfóxido. Os números de micronúcleos foram cerca de 7 vezes mais elevados em culturas de células tratadas em comparação com o controle não tratado. Não foi observada mutagenicidade com DMSO e diluídos no soro fisiológico misturado com o AH Plus no período de 24 h. Portanto, não há evidências da indução de mutações cromossômicas na pasta recém-misturada de AH Plus.

Miletic et al. (2003) estudaram *in vitro* o efeito citotóxico e mutagênico do AH26 e AHPlus. Os efeitos citotóxicos em células de hamster chinês V79 foram incubadas em diluições dos cimentos. Os materiais foram misturados e após 1 h diluídos com dimetil sulfóxido (DMSO) por 1 h, 24 h e 7 dias. Também foram diluídos em soro fisiológico, em seguida, triturado e diluídos em DMSO por 24 h. Foram examinados os efeitos mutagênicos do AH26 e do AH Plus em três concentrações: 5.57, 16.7 e 55.7 µg/ mL. A aberração na estrutura do cromossomo foi analisada pelo teste do micronúcleo. Ambos os materiais foram citotóxicos em doses maiores do que 55,7 µg/mL, exceto para AH26, após 7 dias. AHPlus foi um pouco citotóxico na concentração de 16,7 µg/ mL, exceto após 7 dias. Nem o AH26 nem o AHPlus induziram aumento significativo de aberrações cromossômicas ou formação de micronúcleos nos tempos e concentrações estipuladas. Não houve mutagenicidade encontrada para AH26 e AH Plus em condições *in vitro* altamente controladas.

Silva GO(2011) avaliou a citotoxicidade e genotoxicidade de quatro cimentos endodônticos (EndoREZ, RoekoSeal, AHPlus e cimento

experimental à base de óleo- resina da *Copaifera multijuga*) utilizando ensaios biológicos. Os meios de cultura foram expostos aos cimentos após 12 h do endurecimento destes. Células V79 foram expostas às diluições dos extratos por 24 h e a sobrevivência celular foi mensurada fotometricamente. A viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT em espectrofotômetro e a genotoxicidade, indicada pela formação de micronúcleos, foi determinada após 24h do período de exposição. Os resultados da taxa de sobrevivência celular e a quantidade de danos ao DNA foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). A citotoxicidade em relação ao grupo controle decresceu na seguinte ordem EndoREZ > Copaiba \geq AH Plus > RoekoSeal. A formação de micronúcleos (MN) para indicar a genotoxicidade foi induzida somente pelos extratos do EndoREZ, sendo mais genotóxico que o EMS (controle positivo).

Van Landuyt et al. (2012) buscaram avaliar o potencial genotóxico de cimentos obturadores de resina (epóxi ou metacrilato) em induzir quebras no DNA (DSBs). Fibroblastos gengivais humanos (HGFs) foram cultivados em frascos de cultura de células. Os fibroblastos foram colocados em contato com concentrações não tóxicas dos cimentos de resina epóxi (AH plus Jet) e dos cimentos a base de metacrilato (EndoREZ e Real Seal). O hidróxido de cálcio (Calcicur, Votso, Cuxhaven, Alemanha) foi escolhido como controle. Para determinar as concentrações de efeito máximo (EC50) e concentrações subtóxicas dos extratos, a citotoxicidade dos cimentos foi testada por meio do ensaio de XTT. Os HGFs foram semeados em placas de 96 poços a uma concentração de 20.000 células por poço (100 mL por poço). Após 24 h de incubação, o meio foi removido e substituído pelos extratos não diluídos e diluídos. Após 24 h, as células foram lavadas, e uma mistura de XTT foi adicionado. O teste XTT analisa a atividade metabólica das células através da detecção do formazan, o qual é um produto da clivagem dosal de tetrazólio XTT. Após o teste de imunofluorescência H2AX foi usado para detectar microscopicamente DSBs DNA e para estes experimentos, foi

desenvolvido um novo algoritmo personalizado no Photoshop (Adobe) para quantificá-los. A citotoxicidade dos extratos nas 24 h poderam ser relacionadas da seguinte forma: AH plus Jet > Real Seal > Endo REZ > Hidróxido de cálcio. Os resultados deste estudo não mostram nenhuma evidência para a indução de DNA DSBs por cimentos endodônticos, mas mais pesquisas são necessárias para avaliar outras vias genotóxicas.

2.3 Resistência adesiva dos cimentos

Obturar o canal radicular é fornecer uma vedação contra a entrada de microorganismos e fluidos dentro do espaço do canal radicular desinfectado. Idealmente, os materiais de obturação devem formar uma forte aderência com a parede do canal e resistir ao deslocamento durante a função mastigatória.

Zhang et al. (2009) investigaram a capacidade de selamento apical do cimento endodôntico iRoot SP. Foram utilizados sessenta e oito dentes humanos unirradulares, a parte coronal de cada dente foi removida e os canais radiculares foram preparados com limas ProTaper. Os espécimes foram divididos em 3 grupos de 20 dentes cada: Grupo A foram obturados com iRoot SP usando a técnica da condensação contínua; Grupo B foram obturados com iRoot SP usando uma técnica do cone único; Grupo C foram obturados com AH plus por meio da técnica de condensação contínua. A avaliação da infiltração apical foi realizada com um método de filtração de fluidos nos períodos de 24 h e 1, 4 e 8 semanas. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar qualitativamente os diferentes grupos. Analisaram que não houve diferença significativa na filtração de fluido entre os grupos, bem como nenhum efeito sobre o tempo de escoamento ($p > 0,05$). IRoot SP foi equivalente ao cimento AH Plus em capacidade de selamento apical.

Costa et al. (2010) avaliou a resistência adesiva através do teste de push-out de Epiphany SE, Epiphany e o híbrido Root Seal às paredes de dentina dos canais radiculares. Sessenta raízes de caninos foram preparadas e distribuídas em seis grupos (n = 10) de acordo com o material obturador: GI - Epiphany SE, GII – Epiphany primer e cimento, GIII - Epiphany primer, cimento e solvente resinoso, GIV - Clearfil DC bond e cimento Epiphany, GV - Clearfil, Epiphany cimento e solvente e GVI - híbrido Root Seal. Foram utilizados Cones Resilon em todos os grupos. As raízes foram seccionadas para obter três fatias de cada terço. Uma fatia foi submetida ao teste de push-out (MPa), e os resultados foram analisados. As outras duas fatias foram preparadas para digitalização em microscopia eletrônica de varredura (MEV). O modo como ocorreu a falha também foi analisada. A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ocorreu entre o híbrido Root Seal e outros materiais, GI, GII, GIII, GIV e GV, não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Foram observadas predominantemente falhas adesivas nos grupos I, II, IV e V, enquanto falhas mistas e coesivas foram as mais frequentes nos grupos III e VI, respectivamente. Houve falhas na interface adesiva de GI e GII, áreas de continuidade do material com a dentina no GIV e GV e boa adaptação da interface da GVI. O híbrido Root Seal apresentou uma maior resistência de adesão na dentina do canal radicular do que Epiphany SE e Epiphany. O uso do primer, sistema solvente e sistema adesivo não influenciou na adesão do Epiphany.

Stiegemeier et al. (2010) avaliaram as forças de ligação push-out de diferentes materiais obturadores. Foram utilizados quarenta dentes humanos unirradiculares, que foram instrumentados e irrigado usando NaOCl a 5,25%, ácido etilenodiaminotetracético 15%, e água esterilizada. Os dentes foram, então, preenchidos com (Resilon e RealSeal), (Resilon e RealSeal SE), (Resilon e MetaSeal) e (gutta-percha/ cimento EWT). A resistência de união foi calculada e submetida à análise estatística. As fatias foram examinadas usando um microscópio estereoscópico de 30

× para determinar a falha. A média da resistência de união do push-out foram as seguintes: Resilon / Rea ISeal, $1,45 \pm 0,99$ MPa; Resilon / Real Seal SE, $0,88 \pm 0,49$ MPa; Resilon / Meta Seal, $2,41 \pm 1,7$ MPa; e gutta-percha/ cimento EWT $2,32 \pm 0,74$ MPa. As forças de ligação push-out no Resilon / MetaSeal e gutta-percha/ EWT foram maiores do que o Resilon / RealSeal ou Resilon / RealSeal SE. O Resilon / MetaSeal e gutta-percha/EWT não diferiram significativamente.

Ersahan e Aydin (2010) avaliaram a resistência de união push-out de iRoot SP (Inovador Bioceramix, Vancouver, Canadá) e comparam com a de outros cimentos endodônticos. Sessenta caninos superiores humanos foram seccionados abaixo da junção cimento-esmalte para obter 120 discos (4 mm de espessura de dentina) que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 30$) para o tratamento com um dos quatro cimentos diferentes (iRoot SP, AH Plus, Sealapex, EndoREZ). As cavidades foram preparadas e preenchidas com os cimentos. O Teste de push-out foi realizado utilizando uma máquina universal de ensaios. Falhas na adesão foram avaliadas quantitativamente em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). A resistência de união do iRoot SP e AH Plus foram maiores do que os de Sealapex e EndoREZ. Não houve diferença significativa entre a resistência de união do iRoot SP e AH Plus ($p = 0,274$). Então, iRoot SP e AH Plus apresentaram um comportamento semelhante e melhor do que EndoREZ e Sealapex.

Haragushiku et al. (2010) avaliaram a adesão dos cimentos endodônticos Epiphany, Apexit Plus e AH Plus a dentina de canais radiculares submetidos a diferentes tratamentos de superfície, utilizando o teste de push-out. Cento e vinte e oito raízes de caninos superiores foram incluídos em resina acrílica, os canais foram preparados e divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 32$), de acordo com o tratamento da dentina radicular: (I) água destilada (controle), (II) EDTA 17%, (III), hipoclorito de sódio 1% e (IV), Er: YAG com 16 Hz, entrada 400 mJ (saída

240 mJ) e 0,32-J = cm² densidade de energia. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos (n = 8) obturados com Epiphany, Apexit Plus ou AH Plus. Os dados (MPa) foram analisados por análise de variância e teste de Tukey. Uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) foi encontrada entre os cimentos, com exceção para os subgrupos Epiphany, que tiveram resultados estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,01$): AH Plus (4,77- 0,85), Epiphany= mistura manual (3,06 -1,34), Epiphany = automix (2,68- 1,35) e Apexit Plus (1,22-0,33). Os maiores valores de adesão foram obtidos com AH Plus quando a dentina radicular foi tratada com laser Er: YAG e 17% EDTA. O cimento Epiphany apresentou os valores mais baixos de adesão à dentina radicular tratada com EDTA17%. Os cimentos à base de resina tiveram comportamentos adesivos diferentes, dependendo do tratamento das paredes dos canais radiculares. O modo de preparo da Epiphany (seringa automix ou mistura manual) não influenciou a adesão da dentina radicular.

Ghoneim et al. (2011) avaliaram e compararam a resistência à fratura de raízes obturadas com vários sistemas de preenchimento de canal. Utilizaram cinquenta pré-molares inferiores unirradiculares, que tiveram suas coroas seccionadas e obteram raízes de 13 mm. Dez raízes foram deixadas sem preparo e sem preenchimento (controle negativo). Quarenta canais foram instrumentados com Endosequence (Brassler, Savanna, EUA). As raízes foram divididas de acordo com o sistema de obturação em 4 grupos (n = 10): Grupo 1: iRoot SP (Inovador Bioceramix, Vancouver, Canadá) + cone Activ GP (Brassler, Savanna, EUA), grupo 2: iRoot SP + guta-percha (GP), Grupo 3: cimento Activ GP+ cone Activ GP, e grupo 4: cimento Activ GP + GP. Todos os grupos foram obturados usando a técnica de cone único. As raízes de cada grupo foram embebidas em matrizes acrílicas e submetidas ao teste de resistência à fratura utilizando uma carga de compressão (0,5 mm / min) que foi aplicado até ocorrer a fratura. A maior resistência à fratura foi registrada tanto para o grupo controle negativo e grupo 1 (iRoot SP/ cone

Activ GP), sem diferença significativa entre eles, enquanto o menor valor foi relatado no grupo 4 (cone selador Activ GP / GP). O cimento a base de biocerâmica (iRoot SP) é promissor em termos de aumento da resistência *in vitro* à fratura de raízes com tratamento endodôntico especialmente quando acompanhado com cones Activ GP.

Lertchirakarn et al. (2011) avaliaram a resistência à fratura da raiz de incisivos centrais superiores. Utilizaram quarenta dentes que foram instrumentados e divididos aleatoriamente em quatro grupos. Cada grupo foi obturado com condensação lateral, com guta-percha e AH Plus, guta-percha e RealSeal (®), RealSeal (®) e cone RealSeal (®) e RealSeal (®) cone e AH Plus, respectivamente. As raízes foram colocadas na vertical por uma ponta cônica inserida no canal e ligada a uma máquina de ensaios Instron até ocorrer a fratura da raiz. A carga de fratura e o padrão da fratura foram registrados. As propriedades mecânicas dos materiais foram testadas sob carga de compressão. Os resultados foram analisados por meio de análise de variância e teste de Tukey. Utilizou-se um teste t para amostras independentes para comparar as propriedades mecânicas dos materiais de enchimento. A carga para fraturar as raízes obturadas com guta-percha e AH Plus; guta-percha e RealSeal foi significativamente maior do que aqueles obturados usando o sistema RealSeal (cone RealSea com cimento AH Plus). A maioria das linhas de fratura foram na direção buco-lingual. Em testes de compressão dos materiais de núcleo, RealSeal teve um maior fluxo em resposta à carga de guta-percha, sugerindo uma transmissão mais eficaz das forças para a parede do canal nos testes de fratura. A resistência à fratura foi mais baixa usando RealSeal e é provavelmente o resultado de uma transmissão mais eficiente das forças de dentro do canal, em vez de um efeito direto do próprio material.

Sagsen et al. (2012) compararam a resistência à fratura de raízes obturadas com guta percha (GP) e diferentes cimentos endodônticos. Cinquenta e cinco incisivos centrais superiores humanos

foram selecionados e divididos aleatoriamente em três grupos experimentais (Grupos 1-3) e dois grupos de controle (Grupos 4 e 5). Grupo 1: 15 canais radiculares preenchidas com um cimento à base de resinas epóxi (AH Plus) e GP, Grupo 2: 15 canais radiculares preenchidos com um cimento a base de silicato de cálcio (iRoot SP) e GP, Grupo 3: 15 canais radiculares preenchidos com outro cimento à base de silicato de cálcio (MTA Fillapex) e GP, Grupo 4: 5 raízes foram instrumentadas, mas não obturadas, e Grupo 5: 5 raízes não foram nem instrumentadas nem obturadas. A carga de compressão foi realizada utilizando uma máquina universal de ensaios até a fratura ocorrer. A força aplicada no momento da fratura foi registrada em Newtons. Não houve diferenças significativas na resistência à fratura entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$), cujos resultados foram significativamente superiores à do Grupo 4 ($p < 0,05$). Em conclusão, todos os cimentos endodônticos utilizados no presente estudo, aumentaram a resistência à fratura dos canais radiculares instrumentados.

Bhat et al. (2012) compararam os diferentes cimentos endodônticos sobre a resistência à fratura de dentes tratados endodonticamente. Setenta e cinco pré-molares inferiores humanos foram utilizados para o estudo. O comprimento foi padronizado a 14 mm e os dentes foram divididos em cinco grupos diferentes com base no tipo de cimentos obturadores utilizados. Grupo I: Roeko seal + guta percha, Grupo II: AH Plus + guta percha, Grupo III: PULPDENT + guta percha, Grupo IV: Óxido de zinco-eugenol + guta percha, Grupo V: Controle (dentes não obturados). Os dentes foram incluídos em blocos de resina acrílica e a resistência à compressão foi medida usando a máquina de ensaio universal (Instron). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA one-way e teste t não pareado. Todos os grupos apresentaram um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Dentes obturados do Grupo I e do Grupo II apresentaram maior resistência à fratura em relação aos outros três grupos. Foi visto que os

dentos obturados do grupo III apresentou melhor resistência à fratura do que o Grupo IV e não houve significância estatística encontrada entre o Grupo IV e Grupo V. A partir deste estudo, concluiu-se que tanto os cimentos com base de resina eram igualmente eficazes em comparação com a dos cimentos à base de óxido de zinco e o grupo controle. No entanto, não houve resultados significativos quando a comparação foi feita entre óxido de zinco e eugenol e guta-percha e o grupo controle.

El-Ma'aïta et al. (2013) determinaram o efeito da remoção da smear layer na resistência de união push-out entre os diferentes cimentos de silicato de cálcio (CSCs) e a dentina em comparação com a guta-percha, cimento e dentina. Foram utilizados oitenta dentes humanos. As raízes foram divididas aleatoriamente em dois grandes grupos (n = 40). No grupo A, não foi realizada nenhuma tentativa de remoção da camada de smear layer. No grupo B, a camada de smear layer foi removido por irrigação com 1 ml de EDTA 17% durante um minuto. Dentro de cada grupo, as raízes foram divididas em quatro subgrupos (n = 10) de acordo com o material obturador utilizado: ProRoot MTA (subgrupos 1A e 1B), Harvard MTA (subgrupos 2A e 2B) e Biodentine (subgrupos 3A e 3B). Os grupos 4A e 4B (grupo controle), guta percha e cimento AH-plus. A guta-percha foi aplicada nos canais com uma técnica de injeção de termoplásticos (Obtura Spartan, Algonquin, IL, EUA), para permitir a padronização da técnica entre os três terços dos canais. Cada raiz foi seccionada horizontalmente em três níveis diferentes (cervical, médio e apical) para obter três fatias de 2 mm de espessura. A força requerida para deslocar o material de obturação da fatia raiz foi medida utilizando uma máquina de teste universal (Roell Z020, Zwick GmbH & Co. KG, Alemanha). A força máxima em Newton (F-max) em que ocorreu o deslocamento do material de obturação foi registada em MPa. Os dados foram analisados pelo teste two-way ANOVA e teste de Tukey e revelou que a resistência de união push-out é significativamente influenciada pelo material obturador utilizado e com remoção ou não da camada de smear

layer ($P < 0,01$). Nos grupos de CSC (1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B), a força de adesão foi reduzida após a remoção da camada de smear layer. Nos grupos de guta percha e AH plus, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada na resistência de união push-out entre os subgrupos em que a smear layer foi removida ou preservada. As raízes de Biodentine apresentaram maior resistência de união push-out, que foi significativamente maior do que todos os outros grupos em que a smear layer foi removida ou conservada. A Guta-percha e cimento demonstrou a menor aderência da dentina com canal radicular que não foi significativamente influenciada pela remoção da camada de smear layer. Não houve diferença estatisticamente significativa na resistência de união push-out entre o ProRoot MTA e MTA Harvard, tanto da smear layer preservada e removida. Concluíram que a remoção da smear layer é prejudicial para a resistência de união entre cimentos de silicato de cálcio e a dentina do canal radicular.

Guiotti et al. (2014) avaliaram o efeito do hidróxido de cálcio na resistência de união de três cimentos endodônticos disponíveis comercialmente (MTA Fillapex, Sealapex e AH Plus) para o canal radicular. Foram utilizados sessenta caninos humanos e obtidos fatias dos terços cervical, médio e apical. Os canais radiculares foram padronizados e os espécimes foram preenchidos e divididos em seis grupos ($n = 10$): G1, MTA Fillapex; G2, Sealapex; e G3, AH Plus, com aplicação prévia de curativo de hidróxido de cálcio; e G4, G5 e G6, sem aplicação prévia de curativo de demora. Após 7 dias, os espécimes foram submetidos ao teste de push-out. As formas da fratura foram classificadas como adesiva, coesiva ou mista. Os resultados da resistência de união para cada canal radicular variaram de acordo com o cimento, terço radicular e aplicação prévia de curativo. No geral, o hidróxido de cálcio reduziu a resistência de união em todos os terços radiculares, mas a redução foi significativa apenas para AH Plus, na cervical e apical. O AH Plus mostrou uma força de ligação mais alta para todos os terços radiculares em

comparação com os outros grupos. G1, G2, G4 e G5 apresentaram valores de resistência de união semelhantes para todos os terços radiculares. Em conclusão, o hidróxido de cálcio apenas teve um efeito negativo sobre a resistência de união de AH Plus, nos terços cervical e apical. Por outro lado, os valores de resistência de união para MTA Fillapex e Sealapex foram menores do que aqueles para os AH Plus e, ao passo que a falha mista predominou no AH Plus, a falha adesiva predominou no MTA Fillapex e Sealapex.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como finalidade determinar a citotoxicidade e genotoxicidade respectivamente, de sete cimentos obturadores de canais radiculares contemporâneos após sua manipulação, nos períodos de 24 h, 72 h, 1 semana, 1, 3, 6 meses e após um ano da sua manipulação. Além disso, será realizado o teste mecânico de “push-out” para verificação da resistência à fratura desses mesmos cimentos (15 dias e 1 ano após a espatulação).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido ao CEP/CONEP sob o número CAAE 15648413.6.0000.0077 e aprovado pelo parecer número 283.030.(ANEXO A). Foram utilizadas raízes de dentes humanos hígidos unirradiculares, extraídos, por indicações terapêuticas, na clínica do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista (ANEXO B).

4.1 Ensaio citotoxicidade (XTT)

4.4.1 Cultivo das células

Para o experimento foram utilizados fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDLF). As células foram semeadas em meio de cultura previamente preparado e, constituído por meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB) além de, solução de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). A cultura celular foi realizada em frascos próprios para cultivo (Techno Plastic Products AG., Zollstr, Suíça). Em seguida, estes

foram levados para estufa a 37 °C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA), ver Figura 1.

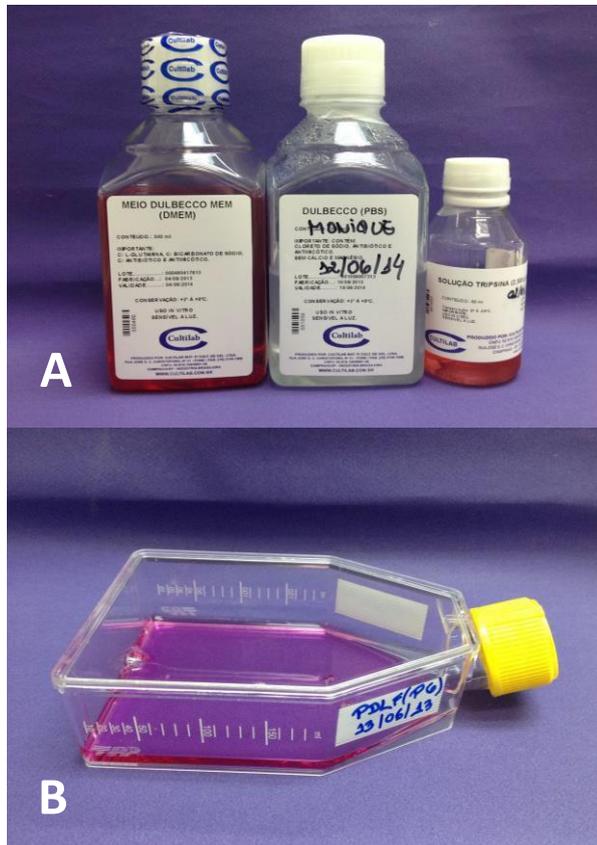


Figura 1 - A) meio de cultura (DMEM), PBS e Tripsina; B) frasco utilizado para cultivo de células.

Após esse cultivo, as células foram semeadas em placas com 96 poços (Techno Plastic Products AG., Zollstr, Suíça), onde receberam os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados são descritas a seguir.

4.1.2 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco grande para cultura de célula (garrafa 75 cm³ – 270 mL), foram pipetados 10 mL de meio de cultura preparado; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada

No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, E U A) que continham as células desejadas (Figura 2A).

Um tubo criogênico (Andradeslab, São Paulo, Brasil) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Petrodidática Indústrias e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo foi despejado no frasco de cultivo contendo meio de cultura (Figura 2B).

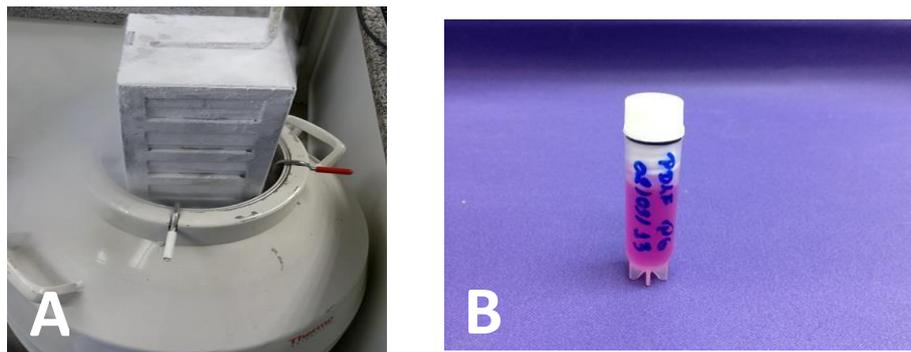


Figura 2 - A) remoção do puxador e da caixa do tambor de nitrogênio; B) tubo criogênico contendo células PDLF.

O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica DFC295 Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça) para verificação da

presença de células e em seguida à estufa a 37 °C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

4.1.3 Troca de meio

A cada 48 h o meio de cultura celular foi trocado. O frasco de cultivo contendo as células foi removido da estufa, e as células foram verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado com pipeta e em seguida as células foram lavadas com 5 mL de PBS (solução salina de tampão de fosfato) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco, e este levado novamente à estufa.

4.1.4 Subcultura

Quando as células crescerem a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) após um período médio de cultivo entre 36 a 48 h, foi necessário realizar a subcultura, passando as células de um frasco de cultivo para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular (Figura 3A).

As células foram removidas da estufa e levadas à capela de fluxo laminar, o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi aspirado. Em seguida, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e este foi aspirado por conseguinte. Foram adicionados ao frasco 3 mL de solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), utilizada para destacar as células. Este frasco foi levado à estufa por 5 min e, em seguida, leves batidas na parte inferior do frasco foram realizadas, para auxiliar na remoção das células. Logo após foram adicionados 6 mL de

meio fresco sobre as células, neutralizando a tripsina.

Todo o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo Falcon, e este levado à centrífuga Centrifuge 5430 (Eppendorf AG 22331, Hamburg, EUA) por 5 min a 500 rpm, e, ao ser retirado, ocorreu a formação de um precipitado de células, denominado *pelet* (Figura 3B).

O sobrenadante foi novamente aspirado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio fresco.

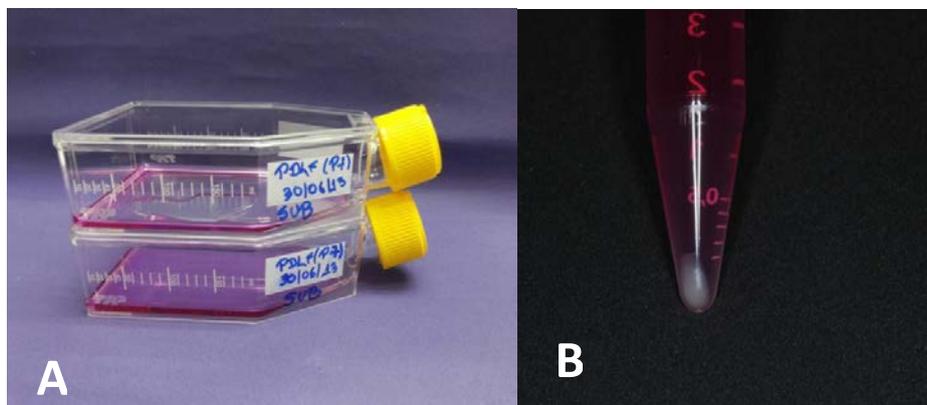


Figura 3 - A) remoção das células de um frasco de cultivo para dois durante o subcultivo; B) precipitado celular (*pelet*).

Após bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de cultivo de mesmo tamanho, contendo 10 mL de meio de cultura cada. Os frascos foram levados novamente à estufa, onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.

4.1.5 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do

plaqueamento para que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet*, sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10 μ L, quantidade necessária levada à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Alemanha) onde foi realizada a contagem do número de células ao microscópio (Figura 4).



Figura 4 – Preparo para realização da contagem celular. A) câmara de Neubauer para contagem celular; B) 10 μ L de meio sendo colocado no interior do compartimento da câmara de Neubauer.

Para obtenção da quantidade de células por mL, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C \times 10^4 = n^\circ \text{ células/mL}$$

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos presentes na câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 8×10^3 células em 200 μ L de meio em cada poço.

4.1.6 Plaqueamento

Foram utilizadas 3 placas de 96 poços para cada período de avaliação. Em cada placa, foram utilizados quatro espécimes (poços) por diluição. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, 12 espécimes por período, para cada grupo experimental (Figura 5).

As placas foram levadas à estufa a 37 °C e em tensão de 5% de CO₂ onde permaneceram por 24 h, até o momento da exposição aos meios de cultura condicionados (diluições).

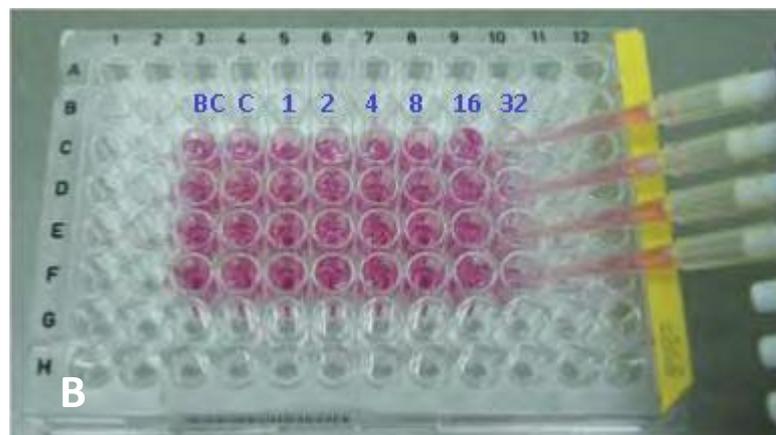


Figura 5 - A) Placas de 96 poços para realizar os experimentos em triplicata; B) Plaqueamento de 200 μ L de meio em cada poço com 8×10^3 células (PDLF).

4.1.7 Levantamento da curva padrão de viabilidade celular

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida através da avaliação do crescimento das células cultivadas sem a aplicação dos meios condicionados em teste. Para obtê-la, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com XTT nos períodos de 24 h, 72 h, 1 semana, 1, 3, 6 meses e 1 ano. Foram avaliados doze espécimes para cada período, que corresponderam ao grupo controle.

4.1.8 Preparo dos extratos originais

Para o ensaio de citotoxicidade, foram utilizados sete cimentos endodônticos: AH Plus, Apexit Plus, EndoRez, Endomethasone N, Roeko Seal, Real Seal e o cimento biocerâmico iRoot SP (Quadro 1). O controle utilizado corresponde à curva padrão de crescimento e viabilidade celular.

Quadro 1 - Composição e procedência dos cimentos testados

Cimentos	Composição	Procedência
AH Plus	<p>AH Plus Pasta A Bisphenol - A epoxy resin Bisphenol - F epoxy resin Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Sílica Pigmentos de óxido de ferro</p> <p>AH Plus Pasta B N,N - Dibenzy-5 - oxanonan - diamine - 1,9 (OPC - 91) 1 - Aminoadamantane Tricyclodecane-diamine Tungstato de cálcio Óxido de zircônio Sílica Óleo de silicone</p>	Dentsply/De Trey, Constança, Alemanha
Apexit Plus	<p>Sais de cálcio(hidróxido, óxido e fosfato) Colofônia hidrogenada Di-salicilato Sais de bismuto (óxido, carbonato) Dióxido de silício altamente disperso (silanizado) Alquil-éster do ácido fosfórico</p>	Ivoclar-Vivadent, Schaan, Listenstaine
Endo Rez	<p>diurethane dimethacrilate (DUDMA) óxido de zinco sulfato de bário pigmentos, iniciadores, inibidores</p>	Ultradent Products Inc, Sul da Jordânia, Utha, EUA
Roeko Seal	<p>Polidimetilsiloxano Dióxido de zircônio Óleo à base de parafina Catalisador de platina Óleo de silicone</p>	RoekoDental Products, Langenau, Alemanha
Real Seal	<p>Primer: aqueous solution acidic monomers AMPS and hydrophilic monomers solution</p> <p>Cimento: -Mix de resinas (UDMA, PEGDMA, EBPADMA, BIS GMA) -sulfato de bário -sílica, -hidróxido de cálcio Oxicloreto de bismuto com aminas e peróxidos Foto- iniciadores, Estabilizantes e pigmentos Pequena quantidade de óxido de alumínio Silane-treated bariumborosilicate glasses</p>	SybronEndo, Orange, Califórnia, EUA
iRoot SP	<p>Fosfato de cálcio Hidróxido de cálcio Silicato de cálcio Óxido de zircônio Agentes de enchimento Espessantes</p>	Bioceramix Inovador, Vancouver, Canadá
Endomethasone N	<p>Acetato de hidrocortisona Óxido de zinco Di-iodo ditimol Sulfato de bário Estearato de magnésio Óleo de Peppermint</p>	Septodont, Saint-Maur, França

Os extratos originais foram preparados seguindo as recomendações da ISO 10993, em uma proporção de 82,4 mm² da área da superfície do espécime por mL de meio de cultura. Para isto, os materiais foram manipulados, sobre placas de vidro, de acordo com as instruções do fabricante, sob condições assépticas, em capela de fluxo, para prevenir o risco de contaminação durante o teste de citotoxicidade. Posteriormente os cimentos foram inseridos em poços de placas contendo 24 poços (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Foram colocados 0,22 mL dos cimentos em cada poço, utilizando uma seringa de insulina de 1 mL (Figura 6A).

Depois de manipulados, os cimentos foram deixados em estufa (5% CO₂ a 37 °C e umidade de 100%) (Thermo Fisher Scientific Inc, E U A) por 24 h, 72 h, 1 semana, 1, 3, 6 e 12 meses de acordo com os tempos de endurecimento pré-estabelecidos para cada grupo (Figura 6B).

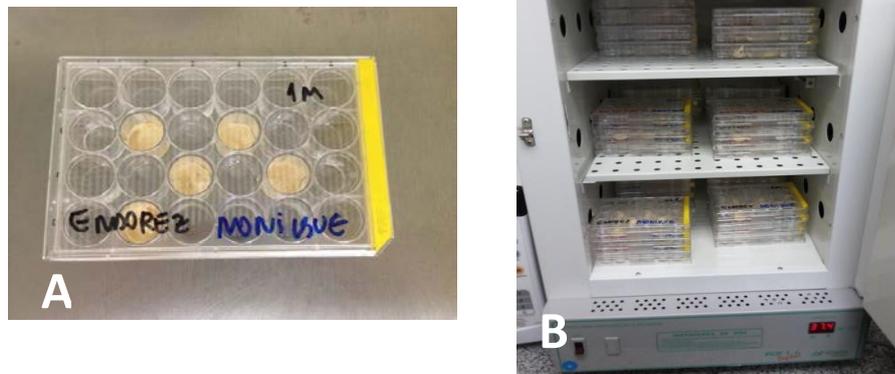


Figura 6 - A) Placa de 24 poços contendo volumes iguais dos cimentos testados; B) Estufa contendo as placas com os cimentos manipulados que ficaram pelos diferentes tempos de endurecimento.

4.1.9 Condicionamento do meio de cultivo

Transcorridos os períodos após a espatulação dos materiais, cada poço contendo os cimentos, foi preenchido com 2,5 mL do meio de cultura (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), com penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Após a colocação de meio, as placas permaneceram em estufa com 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. Posteriormente, 2 mL de meio de cada poço foi removido com auxílio de micropipetas do contato com os cimentos, formando os extratos originais de cada material (Figura 7A e 7B).

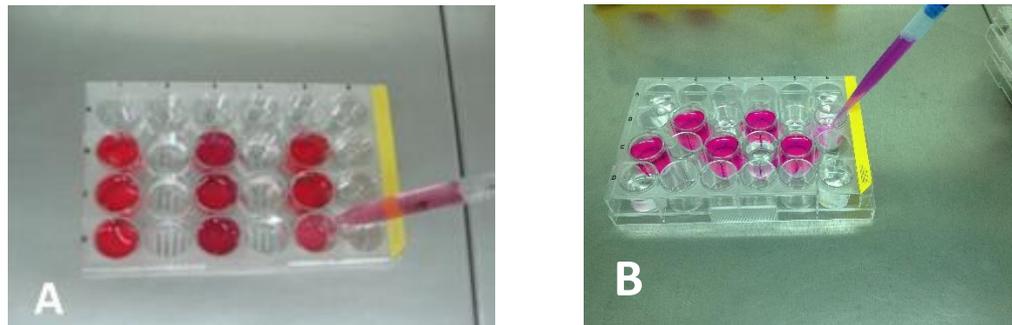


Figura 7 - A) preenchimento dos poços contendo os cimentos com 2,5 mL de meio; B) remoção de 2 mL de cada poço do meio em contato com os cimentos com auxílio de micropipetas.

4.1.10 Diluições

Para o teste de citotoxicidade, foram realizadas seis diluições seriadas a partir do extrato original até a obtenção da diluição 1:32. Para isso seis tubos Falcon foram previamente preenchidos com 2,0 mL de meio de cultura cada um. Posteriormente, foram retirados 2,0

mL dos 4,0 mL do extrato original e colocados no tubo seguinte contendo a mesma quantidade de meio formando assim a diluição 1:1. Essa mistura foi então agitada em vórtex (Biomixer Corp, Hawthorne, Califórnia) para que ocorra a homogeneização. Posteriormente 2,0 mL dessa diluição foram retirados e despejados no tubo seguinte, formando a diluição 1:2. Esse experimento foi repetido sucessivamente até atingir a diluição 1:32 de cada cimento.

Em seguida, 200 μ L dessas diluições (meios condicionados) foram colocados por poço em contato com os fibroblastos (PDLF) anteriormente plaqueados e as placas foram novamente levadas à estufa por 24 h (Figura 8A, 8B e 8C).

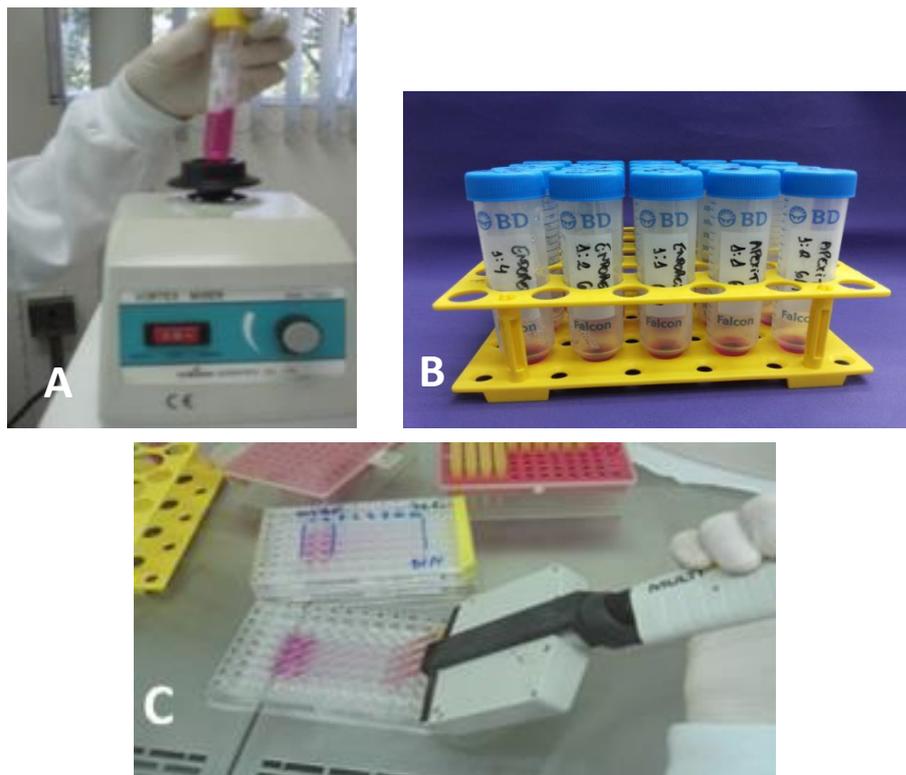


Figura 8 - A) diluição sendo agitada em vórtex para a homogeneização; B) tubos falcon com as diluições seriada do extrato original dos cimentos testados; C) colocação de 200 μ L das diluições (meios condicionados) por poço em contato com os fibroblastos anteriormente plaqueados.

4.1.11 Avaliação da viabilidade e crescimento celular

Após 24 h de contato das células com as diluições dos extratos a viabilidade celular foi determinada pelo teste XTT. O teste baseia-se na habilidade de enzimas mitocondriais da atividade metabólica de células ativas em reduzir moléculas de 2,3 - bis (2 - methoxy - 4 - nitro - 5 - sulphophenyl) -2H - tetrazolium - 5- carboxanilide (XTT) em sal solúvel formazan, de cor alaranjada detectável por uma absorbância de 490 nm.

Foram utilizadas as diluições que obtiveram viabilidade celular próxima a 50%, determinada pelo ensaio de XTT. As diluições mais citotóxicas foram descartadas, pois não permitiram proliferação celular ou causaram apoptose das células existentes não sendo possível realizar contagem de micronúcleos e avaliar os possíveis efeitos genotóxicos.

As diluições foram removidas das placas e 200 µL da solução de XTT preparado foi adicionado em cada poço. A solução de XTT foi preparada diluindo-se 10 mg do pó de XTT, pesado em balança de precisão, em 10 mL de PBS. Após foram acrescentados ao XTT preparado, PBS e Menadiona. Para cada 40 µL do XTT preparado colocou-se 158 µL de PBS e 2 µL de menadiona (pó+ acetona) Como esta solução é sensível a luz, foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 200 µL da solução de XTT foram adicionados a cada poço. Cada placa foi envolvida em papel alumínio e colocada em estufa por 3 h a 37 °C e 5% de CO₂ (Figura 9A, 9B, 9C, 9D, 9E, 9F).

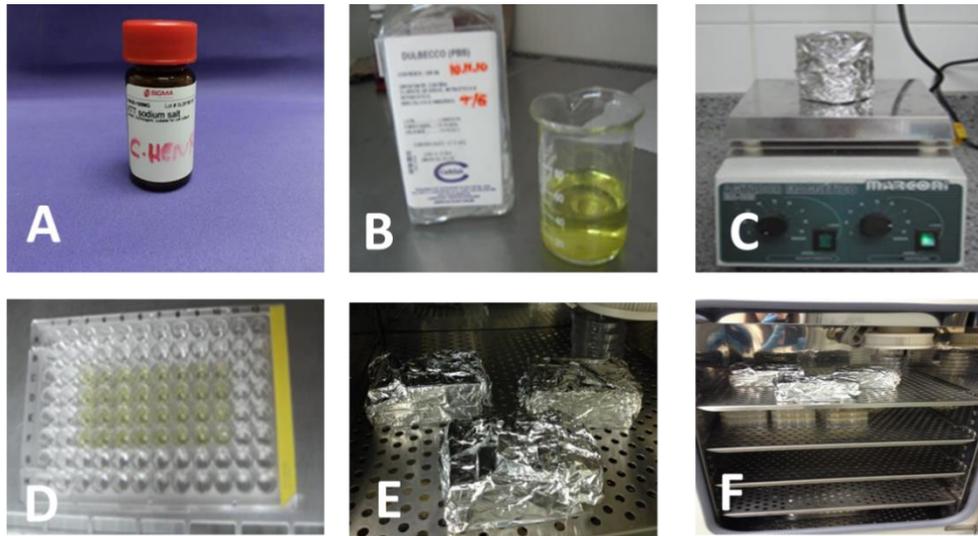


Figura 9 - Ensaio do XTT: A) frasco contendo pó do XTT; B) Becker contendo XTT diluído em PBS; C) solução de XTT protegida da luz com papel alumínio; D) XTT em contato com as células nas placas de 96 poços; E) Placas envoltas em papel alumínio para proteger da luz; F) Placas protegidas com papel alumínio levadas a estufa por 3 h.

Ao término deste período as placas foram levadas à espectrofotômetro (Asys Hitech GmbH, Áustria) previamente programada. A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm (Figura 10A, 10B, 10C).

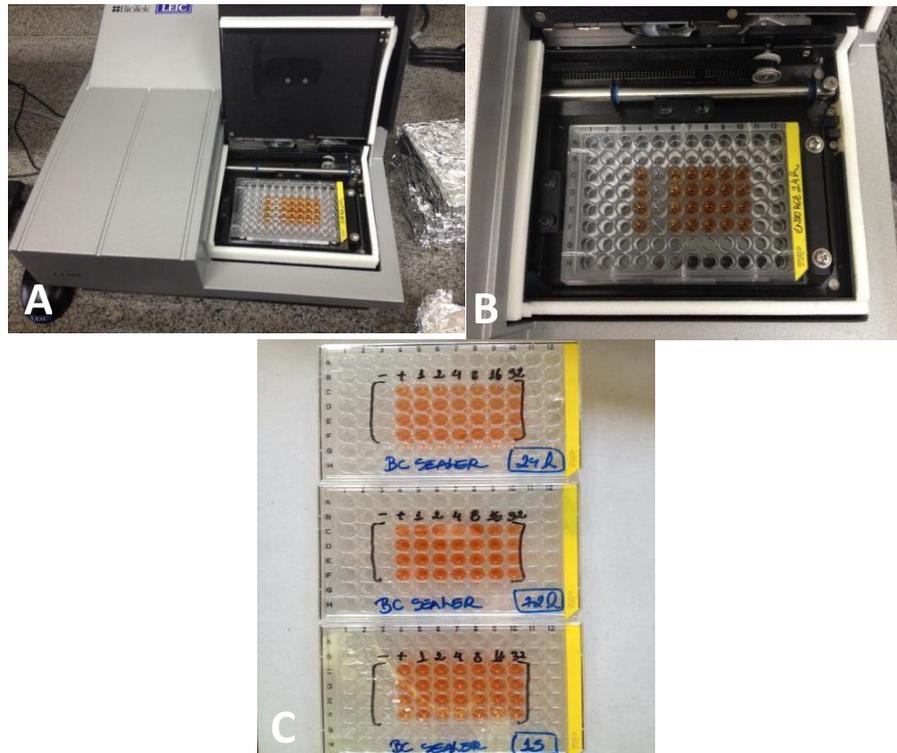


Figura 10 - A) leitora de microplacas (espectrofotômetro); B) placa contendo as células, dentro da leitora; C) placas coradas pelo sal formazan de cor laranja após o teste de XTT.

4.2 Ensaio de micronúcleo (MNT)

O número de micronúcleos foi contado nas culturas celulares expostas às diluições dos cimentos testados, dentre as quais causassem excessivos efeitos citotóxicos sobre as células V79. Para tanto, foram selecionadas as diluições de cada material que se apresentassem mais citotóxicas, e estas foram escolhidas dos períodos extremos (24 h e 1 ano). Além disto, para permitir avaliar e comparar os efeitos genotóxicos, também foram consideradas as diluições que não se apresentassem citotóxicas (viabilidade celular igual ou superior a 50%) de cada material. Uma vez que, as diluições excessivamente citotóxicas não permitiram a proliferação celular, impossibilitando a análise de genotoxicidade pela

formação de micronúcleos.

Os fibroblastos (V79) foram cultivados em meio previamente preparado e constituído de meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). O cultivo das células foi realizado em placas individuais (Thermo Fisher Scientific Inc, E U A), sendo a base de cada placa constituída por uma lâmina de vidro. Em cada placa foi testada uma única diluição. (Figura 11A).

No interior da placa, sobre a lâmina de vidro, foram semeadas uma quantidade de 3×10^5 células em 4 mL de meio preparado por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após esse período, o meio foi aspirado e as células expostas a 4 mL das diluições dos extratos testados e a 4 mL de etilmetano sulfonato 5 mM (EMS) (Sigma Aldrich Co, Alemanha) por 24 h em estufa. O EMS foi utilizado no teste de micronúcleos, como controle positivo, por ser um material comprovadamente genotóxico que causa grande indução de micronúcleos sobre as linhagens células (Schweikl, Schmalz, 2000).

Preparo do EMS: Primeiramente foram preparados 20 mM da seguinte forma; de 10 mL de meio de cultura(DMEM) retirou-se 21,3 µL de meio e acrescentou-se 21,3 µL de EMS. Após foram preparados dos 20 mM os 5 mM coletando 2,5 mL dos 20 mM e acrescentando 7,5 mL de meio de cultura (DMEM).

Posteriormente as placas foram retiradas da estufa e lavadas, individualmente, com 5 mL de PBS, que foi aspirado imediatamente. Em seguida, as células foram fixadas em 4 mL de etanol 100% (Ecibra Ind. Com. Ltda, São Paulo) por 30 min. O etanol foi aspirado e as lâminas de vidro, contendo as células fixadas, foram destacadas das placas e permaneceram em temperatura ambiente por no mínimo 24 h para secagem. Após este período foram colocadas em suporte (berço) para o processo de coloração.

As lâminas foram imersas em 5 N HCl (ácido clorídrico) (Dinâmica Ind. Com. Ltda, São Paulo) por 40 min, lavadas com água destilada e coradas com reagente Schiff (Sigma Aldrich Ltda, São Paulo, Brasil) por 30 min em temperatura ambiente.

Após foram lavadas em água sulfurada (Sigma Aldrich Ltda, São Paulo, Brasil) por 6 min. Preparo da água sulfurada: 208mL de água destilada + 2 mL de 5 N HCl (já pronto) + 10 mL de K₂S₂O₅ 10% (preparo de 10 g de pó para 100 mL de água destilada).

Novamente lavadas em água corrente por 10 min e as células fixadas (álcool 70% por 5 min, álcool 80% por 5 min, álcool 90% por 5 min, álcool 96% por 5 min, álcool 100% em duas vezes de 5 min e xilol por no mínimo 10 min). Finalmente as lamínulas foram coladas sobre as lâminas de vidro com Entellan EasyPath (Erviagas Ltda, São Paulo, Brasil) e aguardou-se 24 h para o início das leituras em microscópio.

Os micronúcleos foram observados em microscópio de luz invertida (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça), sob lente de imersão (100X). Foram avaliadas 1.000 células por lâmina por concentração em quatro experimentos independentes.

Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e cujo tamanho corresponde a uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal.

Somente as células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas. As células em mitose ou que exibam fragmentação nuclear por apoptose também foram contadas a cada 1000 células (Figura 11A, 11B, 11C, 11D).

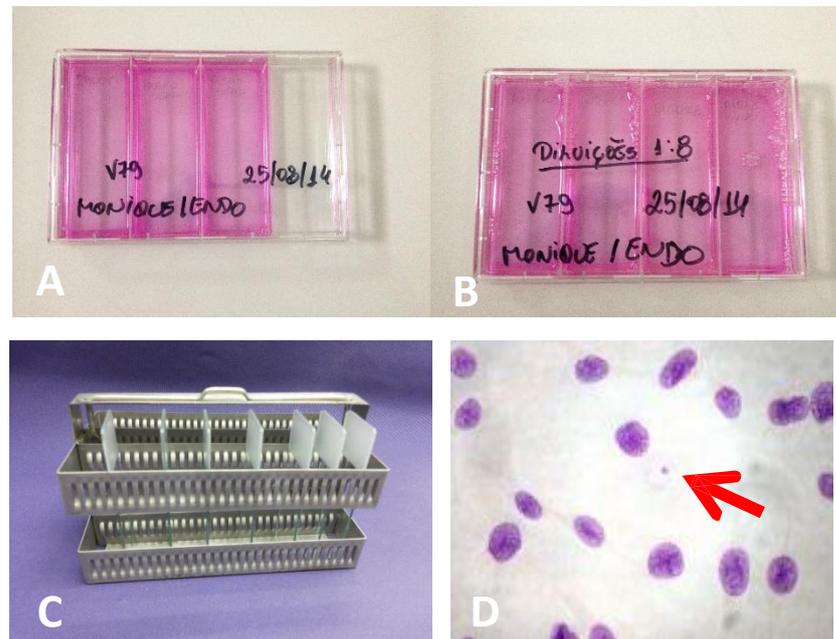


Figura 11 - A) cultivo celular na placa contendo a lâmina de vidro para o ensaio de micronúcleo; B) células expostas às concentrações testadas no tempo de 24 h e 1 ano; C) lâminas de vidro em berço após a fixação em álcool 100%; D) seta indicando micronúcleo.

4.3 Ensaio de “push-out”

4.3.1 Preparo dos dentes

A resistência adesiva às paredes do canal radicular de todos os cimentos testados foi avaliada usando o teste de “push-out”. Foram utilizados cento e quarenta dentes humanos unirradiculares que foram mantidos em solução fisiológica e congelados até o momento de sua utilização. Em cada ensaio inicial (15 dias) e final (1 ano) foram utilizados 70 dentes.

A coroa de cada dente foi seccionada na junção cimento-esmalte, utilizando disco de carborundum (KG Sorensen, Barueri,

SP, Brasil) sob refrigeração. O comprimento de trabalho (CT) foi obtido visualmente subtraindo 1 mm do comprimento de uma lima Kerr # 10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) do forame principal. Os canais radiculares foram preparados biomecanicamente com o sistema rotatório Mtwo (VDW GmbH, München, Alemanha) primeiro utilizando a série 701 de 25 mm limas 10 - 25 e após a série 702 de 25 mm limas 25 - 40 por todo comprimento do canal.

Durante todo o preparo biomecânico (PBM) e a cada troca de lima, os canais foram irrigados com 2 mL de solução 1% de hipoclorito de sódio. Ao final do PBM, os canais foram preenchidos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% por cinco minutos. Finalmente irrigados com 5 mL de solução salina fisiológica e secos com cones de papel (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Após a instrumentação os dentes foram distribuídos aleatoriamente em sete grupos (n = 10), de acordo com o cimento obturador empregado.

Em todos os grupos os cimentos foram aplicados no interior do canal radicular com o auxílio de um lentulo (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) adaptado a peça de baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para impedir a formação de falhas ou bolhas durante a obturação. Após a inserção do cone principal *taper* #04 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), três cones acessórios foram também inseridos de acordo com a técnica de condensação lateral ativa. O excesso foi removido com ajuda de um instrumento aquecido e o restante condensado com um calcador (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Todos os canais foram fechados com um material selador temporário (Cimpat, Septodont Brasil Ltda, Barueri, SP, Brasil). Os dentes foram mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, antes da realização do teste de *push-out*, ficando armazenados em placas de Petri em meio úmido, sobre gaze embebida em água destilada (Figura 12A, 12B).

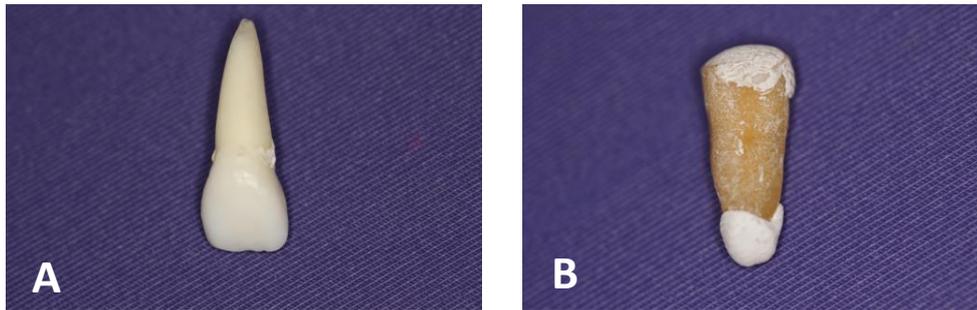


Figura 12 - A) dentes humanos unirradiculares; B) raiz fechada com um material selador na cervical e apical (mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO₂).

4.3.2 Obtenção dos espécimes

Com o auxílio de um molde de silicone laboratorial (Silibor – 1 cm²), foram realizados modelos circulares, em resina acrílica incolor (Jet, Artigos Odontológicos, SP, Brasil) e sobre a superfície foi colocada horizontalmente a raiz fixada com cera pegajosa em bastão (Asfer, São Paulo, Brasil) (Figura 13A).

Os espécimes foram fixados em uma base metálica na máquina de corte LabCut 1010 (EXTEC Technologies Inc. Enfield, CT, EUA) e seccionados perpendicularmente ao longo eixo da raiz (perpendicular ao eixo *y*), com disco diamantado WFR BLDE 4" X 0.12" X 1/2" (EXTEC-ERIOS) sob constante refrigeração de água (Figura 13B). A primeira fatia cervical, de aproximadamente 1 mm de espessura foi descartada, pois inerentes imperfeições na zona adesiva, devido, principalmente, à presença de oxigênio, que pode influenciar nos resultados.

Antes do corte de cada fatia, foram realizadas marcações com caneta retroprojeter na superfície de maior diâmetro do espécime, com o intuito de destacar esta face para o posterior posicionamento do espécime no momento do teste. Durante o ensaio de *push-out*, a fatia deve sempre permanecer com o lado de maior diâmetro para baixo, facilitando

a extrusão do cimento do canal, já que este apresenta uma forma cônica.

Os espécimes foram seccionados formando fatias de 2 mm de espessura para realização do teste de *push-out* dos terços cervical, médio e apical (Figura 13C). A padronização da espessura dos cortes foi determinada com auxílio do dispositivo nônio, o qual foi girado 4 vezes (0,5 mm a cada volta) para corte de uma fatia (Figura 13D).

Nove fatias com 2 mm de espessura cada foram obtidos para cada raiz, sendo três fatias para cada terço. A primeira fatia de cada terço foi selecionada para o ensaio de *push-out* (Figura 13E).

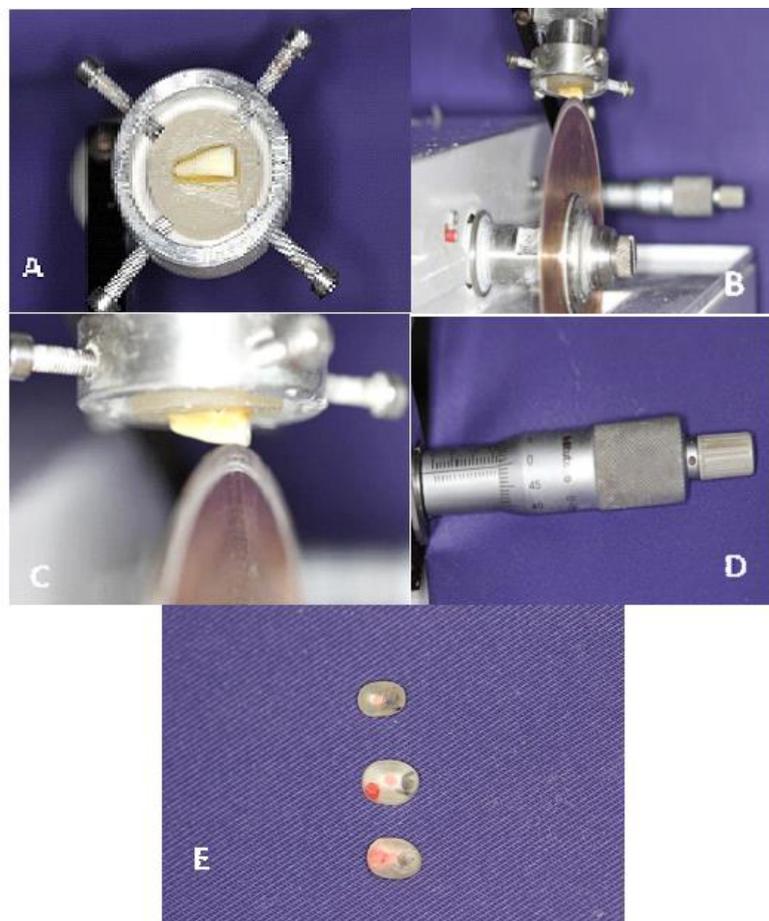


Figura 13 - A) espécime fixado na base metálica da máquina de corte LabCut 1010; B) disco diamantado (EXTEC-ERIOS) sob constante refrigeração de água; C) espécime sendo seccionado formando fatias de 2 mm de espessura para realização do teste de *push-out*; D) dispositivo nônio, o qual foi girado 4 vezes (0,5 mm a cada volta) para o corte de uma fatia; E) fatias dos terços cervical, médio e apical confeccionados após o corte na LabCut.

4.3.3 Ensaio mecânico

Durante o ensaio mecânico, cada espécime foi posicionado sobre um dispositivo metálico com abertura central maior que o diâmetro do canal. A face de maior diâmetro do espécime foi posicionada para baixo, ou seja, a carga foi aplicada de apical para cervical até que a obturação se deslocasse ou ocorresse a fratura do espécime.

Para o ensaio de *push-out*, um cilindro metálico adaptado (\emptyset extremidade = 0,6 e 6 mm no seu longo eixo) induziu a carga sobre a porção central da obturação, sem que a carga fosse aplicada sobre a dentina. Considerando que os espécimes foram seccionados perpendiculares ao seu longo eixo, o cimento obturador recebeu carga paralela ao longo eixo da raiz. O teste foi executado em máquina de ensaio universal EMIC modelo DL-1000 (Equipamentos e sistemas Ltda, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) com velocidade de 1 mm/min e célula de carga 50 Kgf. A resistência adesiva foi obtida pela fórmula:

$$\sigma = C/A,$$

onde **C** = carga para ruptura do corpo de prova (kgf), **A** = área interfacial (mm^2). Para o cálculo da área adesiva (A) dos espécimes, foi empregada a fórmula para cálculo da área lateral da figura de um tronco de cone circular reto de bases paralelas (Figura 14).

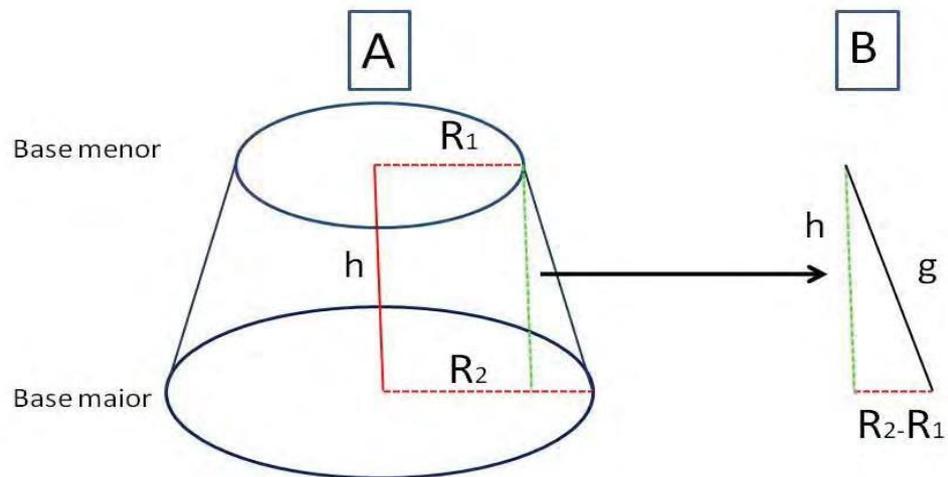


Figura 14 - A) Desenho esquemático correspondente à secção interna do corpo de prova (paredes radiculares) – figura geométrica de um tronco de cone circular reto de bases paralelas, onde h é a altura do espécime, R_1 é o raio da base menor e R_2 é o raio da base maior; B) Figura geométrica (triângulo) para cálculo da geratriz g do tronco de cone.

Então, $A = \pi \cdot g \cdot (R_1 + R_2)$, onde, A = área interfacial, $\pi = 3,14$, g = geratriz do tronco, R_1 = raio da base menor, R_2 = raio da base maior, h = altura da secção. Para o cálculo da geratriz do tronco de cone g foi utilizado o Teorema de Pitágoras – “quadrado da medida de hipotenusa = a soma dos quadrados das medidas dos catetos”. Assim, para o cálculo de g , a seguinte fórmula foi utilizada: $g^2 = h^2 + [R_2 - R_1]^2$.

Os valores de R_1 e R_2 foram obtidos pela medição dos diâmetros da base menor e maior do corpo de prova, respectivamente. Esses diâmetros e a altura h do corpo de prova foram medidos após ensaio com paquímetro eletrônico digital (Starret Indústria e Comércio Ltda, Itu, São Paulo, Brasil).

O resultado da resistência adesiva σ era inicialmente em kgf/mm^2 e em seguida transformado para MPa, multiplicando-se o valor de σ por **10**, considerando a seguinte equiparação de medidas: $1 \text{ kgf}/\text{mm}^2 = 10 \text{ N}/\text{mm}^2 = 10 \text{ MPa}$.

A força necessária para deslocar o cimento foi obtida em

MPa, e os dados foram posteriormente submetidos a análise estatística. (Figura 15A, 15B, 15C).

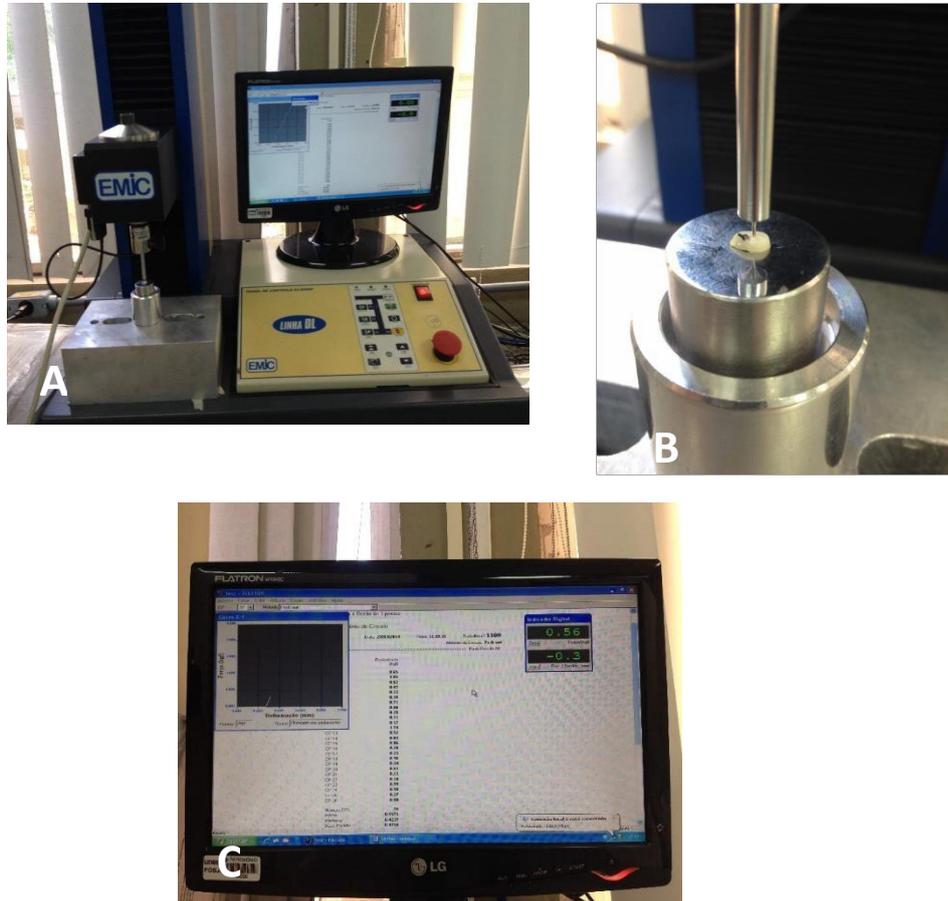


Figura 15 - A) máquina de ensaio universal EMIC modelo DI - 1000; B) espécime posicionado sobre um dispositivo metálico com abertura central maior que o diâmetro do canal e um cilindro metálico adaptado (\varnothing extremidade = 0,6 e 6 mm no seu longo eixo) induzindo a carga sobre a porção central da obturação; C) visor da máquina de ensaio universal EMIC mostrando os valores da força máxima que o espécime obteve até o deslocamento da obturação.

4.4 Análise estatística

A análise estatística do ensaio de viabilidade celular (XTT) e do teste de genotoxicidade (MNT) em cultura de células, colocadas em contato com os meios condicionados em relação ao grupo controle; e o teste físico de push-out foi avaliada através do teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparações dos pares entre os grupos, ambos com nível de significância de 0,05%.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de citotoxicidade(XTT)

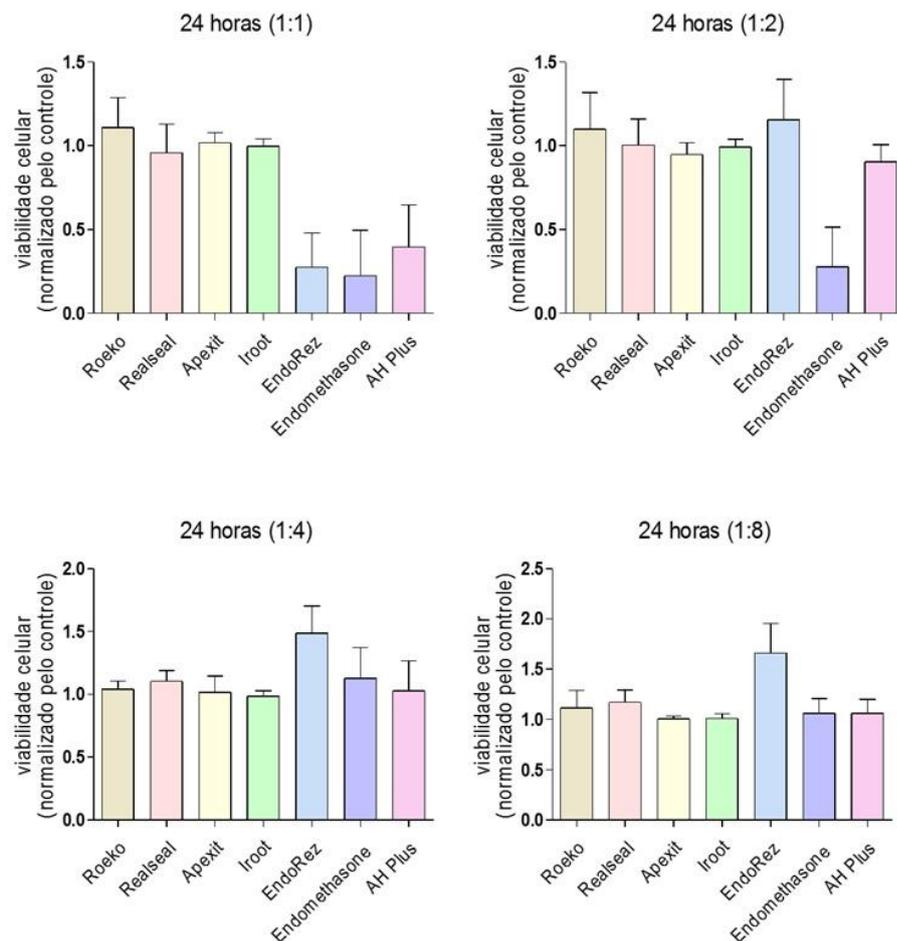


Figura 16 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 24 h. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

Em relação a citotoxicidade nos períodos analisados, nas primeiras 24 h na diluição 1:1 os cimentos Apexit Plus (AP), Iroot SP (IR) e

Real Seal (RE) não apresentaram diferença estatisticamente, e nem os cimentos EndoRez (ER) e Endomethasone N (EM) entre si. Os cimentos Roeko Seal (RO) e AH Plus (AH) mostraram-se estatisticamente diferentes, sendo o RO o menos citotóxico e o EM o mais tóxico. Na diluição 1:2 RO, IR e RE não foram estatisticamente diferentes, mas diferenciaram do AP, AH, EM. ER demonstrou menor e EM maior. Na diluição 1:4 RO, AP e AH foram estatisticamente semelhantes mas diferenciaram dos demais, o ER manteve-se o menos citotóxico. Na diluição 1:8 RO, EM e AH foram estatisticamente semelhantes, assim como IR e AP foram semelhantes entre si. ER continuou o de menor citotoxicidade.

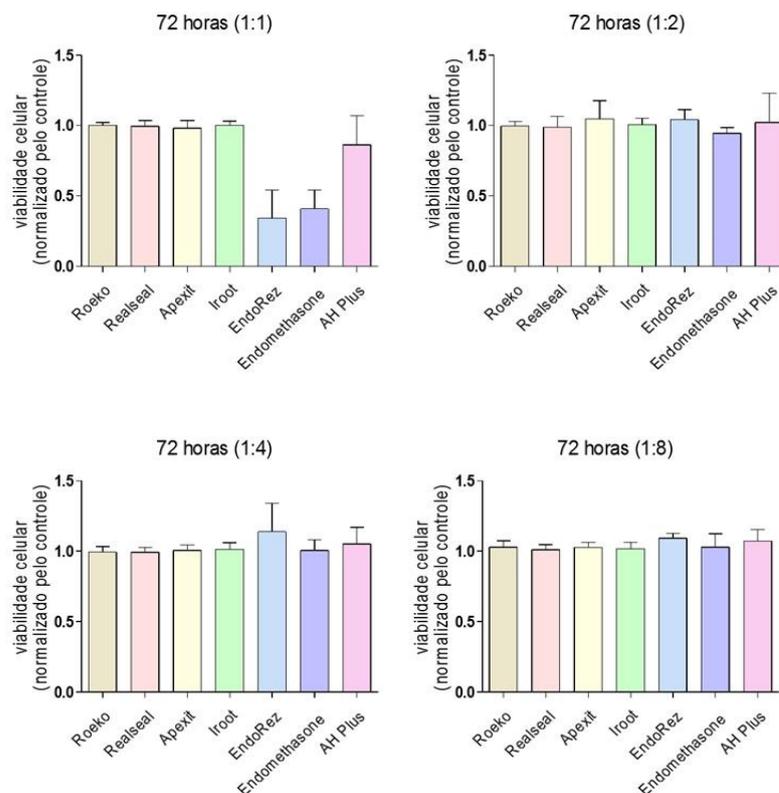


Figura 17 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 72 h. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

Após 72 h de endurecimento, na diluição 1:1 IR, RO, RE e

AP não demonstraram diferenças estatisticamente entre si, os demais. ER > EM > AH seguiram esta ordem decrescente de citotoxicidade. Na diluição 1:2 IR, RO, RE e AH não apresentaram diferença, assim como ER e AP entre si. EM mostrou maior citotoxicidade. Na diluição 1:4 AP, RE, EM e RO foram estatisticamente semelhantes entre si, assim como AH e IR. ER mostrou ser o de menor citotoxicidade. Na diluição 1:8 AH, RO e AP foram semelhantes e IR, EM e RE também foram semelhantes entre si. ER continuou demonstrando ser o de menor toxicidade.

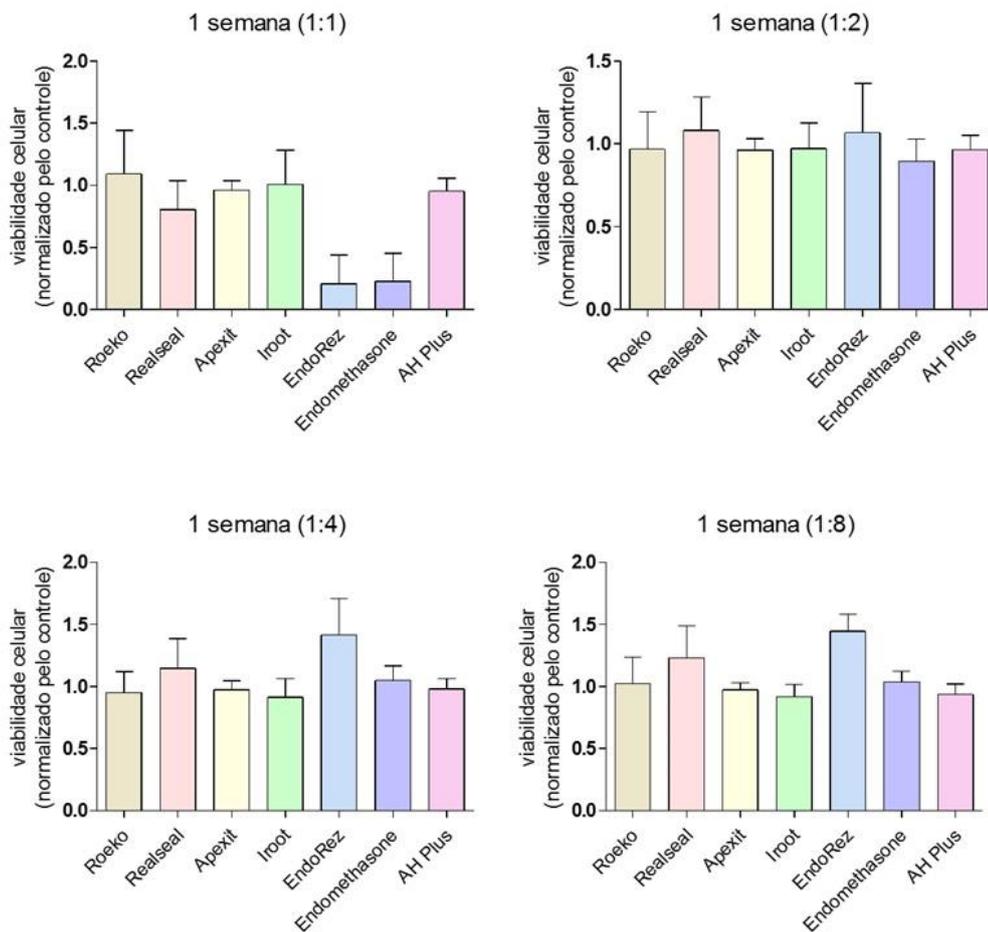


Figura 18 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 1 semana. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

Após 1 semana do tempo de presa, na diluição 1:1 os

cimentos AP, AH, RO e IR não foram estatisticamente diferentes demonstrando serem os que permitiram uma maior viabilidade celular. ER e EM mostraram ser os mais citotóxicos neste período de análise. Na diluição 1:2 todos os cimentos não apresentaram diferenças entre si, mantendo a viabilidade celular em alta. Na diluição 1:4 RE e EM não obtiveram diferenças estatísticas entre si, assim como entre os grupos AP, AH RO e IR. ER demonstrou menor toxicidade. Na diluição 1:8 EM, RO e AP foram semelhantes entre si, assim como AH e IR. ER foi o que se mostrou superior mantendo uma alta viabilidade celular.

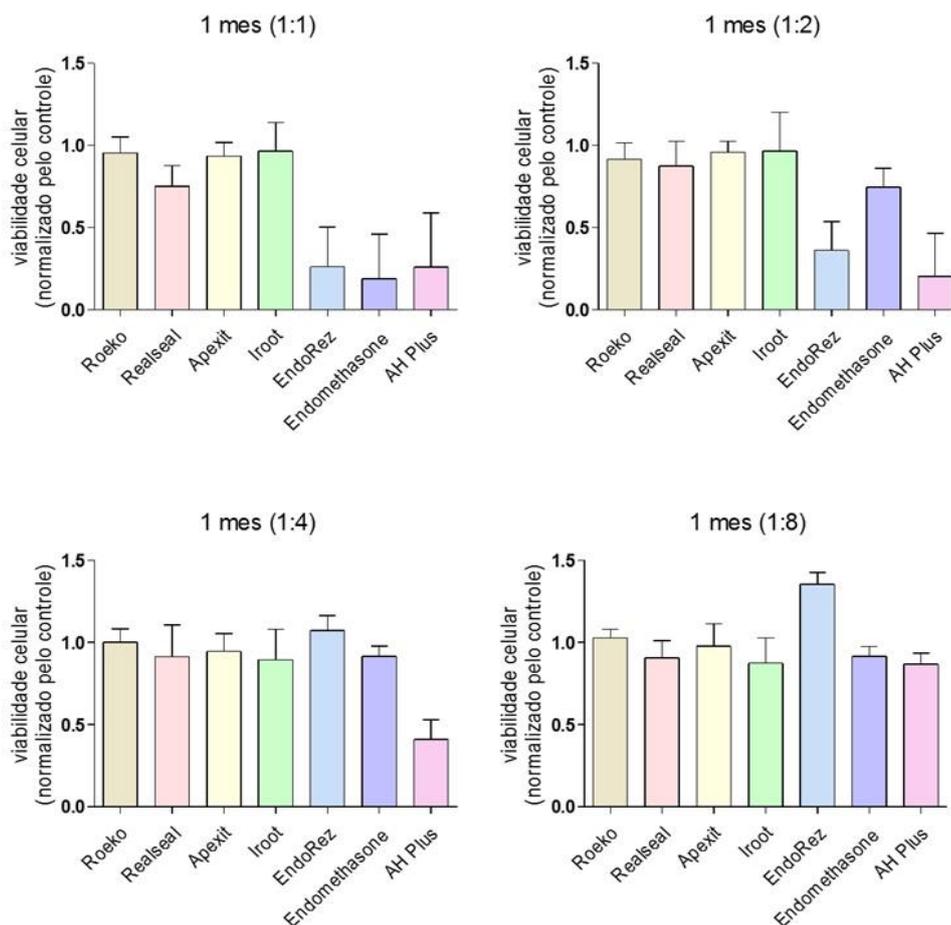


Figura 19 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 1 mês. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

Após 1 mês de análise os cimentos demonstraram na diluição 1:1 IR, RO e AP serem estatisticamente semelhantes e

apresentaram melhor viabilidade celular comparado ao grupo controle; ER, AH e EM foram semelhantes entre si e foram os mais citotóxicos. RE se diferenciou dos demais. Na diluição 1:2 AP, IR, RO e RE foram estatisticamente semelhantes e mantiveram uma sobrevivência celular semelhante ao grupo controle. ER e AH foram semelhantes entre si, sendo os mais citotóxicos em ordem decrescente AH > ER. Somente EM se diferenciou dos demais. Na diluição 1:4 somente o AH foi estatisticamente diferente dos demais apresentando uma citotoxicidade alta, menor que 50% de sobrevivência celular. Todos os outros cimentos mantiveram a viabilidade celular próxima ao grupo controle. Na diluição 1:8 AP, EM, RE e IR foram estatisticamente semelhantes, ER apresentou a maior viabilidade celular, seguido pelo RO. O AH conseguiu recuperar a viabilidade celular, em relação às outras diluições, aproximando as condições ao grupo controle.

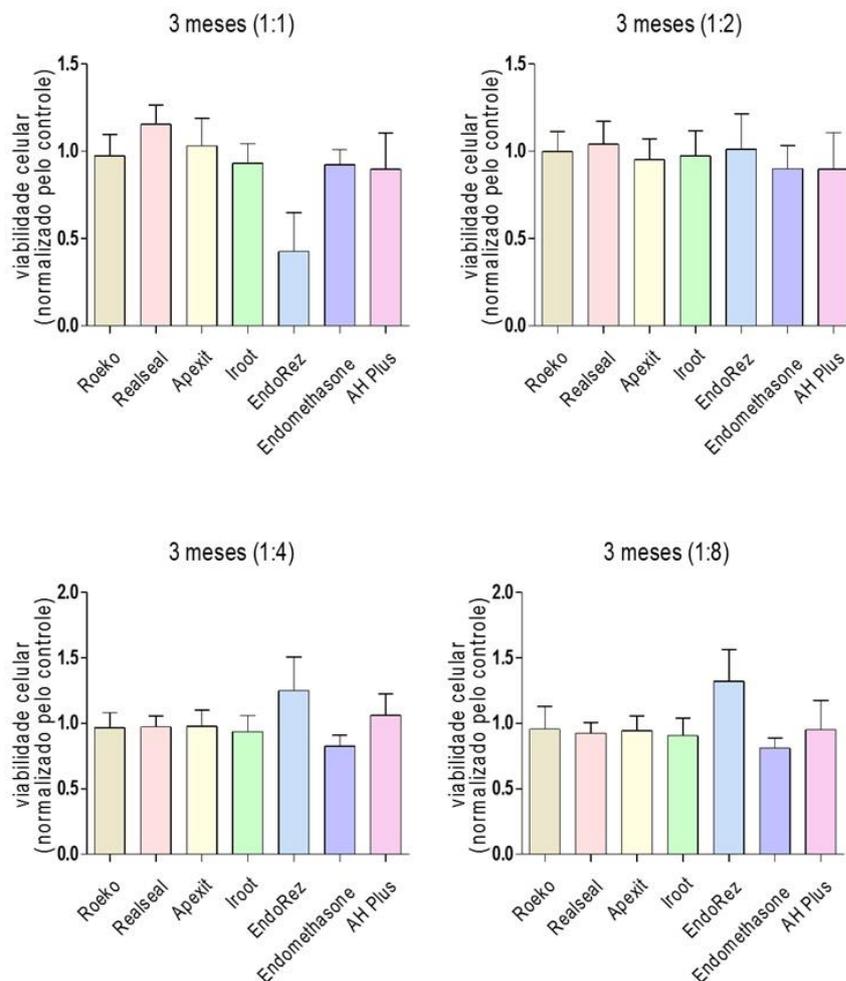


Figura 20 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 3 meses. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

No período após 3 meses, na diluição 1:1 AP e RO foram semelhantes estatisticamente entre si, assim como os grupos IR, AH e EM. RE foi o que apresentou melhor viabilidade celular e o ER foi o que permitiu menor sobrevivência celular. Na diluição 1:2 todos os cimentos foram semelhantes estatisticamente e mantiveram a viabilidade celular próxima ao grupo controle. Na diluição 1:4 AP, RE, RO e IR apresentaram resultados semelhantes com taxa de sobrevivência celular próxima ao grupo controle. ER e AH foram estatisticamente semelhantes entre si e

permitiram uma boa viabilidade das células. EM apresentou a menor viabilidade celular em relação aos demais. Na diluição 1:8 RO e AP foram semelhantes entre si, assim como AH, RE, IR e EM, todos mantiveram a viabilidade celular próxima ao grupo controle. ER foi o cimento que apresentou a melhor viabilidade celular.

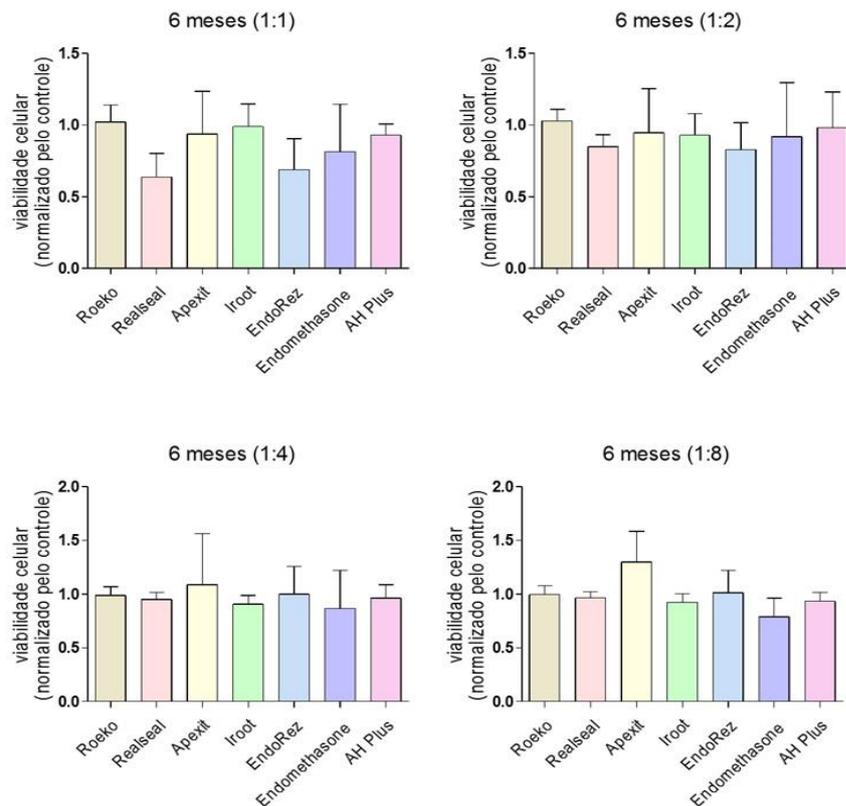


Figura 21 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 6 meses. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

Após um período de 6 meses de endurecimento, na diluição 1:1 RO e IR mostraram-se semelhantes e apresentaram sobrevivência celular próxima ao grupo controle. AP e EM foram estatisticamente semelhantes entre si. A viabilidade celular em ordem decrescente foi: AH > EM > ER > RE. Na diluição 1:2 somente RO e ER foram diferentes estatisticamente dos demais cimentos, RO apresentou melhor taxa de viabilidade celular e ER o de menor. Na diluição 1:4 os sete cimentos não diferiram estatisticamente mantendo a viabilidade de suas

células próxima ao grupo controle. Já na diluição 1:8 ER, RE e AH mostraram-se semelhantes entre si. AP foi o cimento que apresentou maior taxa de sobrevivência celular e EM o de menor viabilidade celular mantendo-se superior a 50%

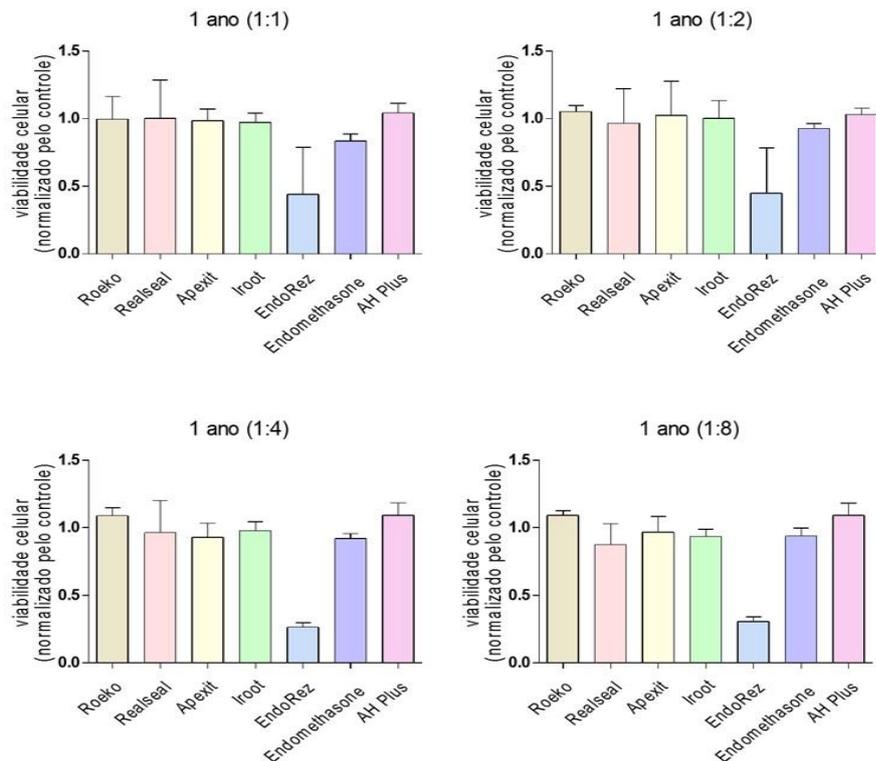


Figura 22 - Citotoxicidade dos materiais em células PDLF após a exposição às diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8, por um período de 1 ano. As barras representam a viabilidade celular, com os valores normalizados pelo controle.

Depois de 1 ano de endurecimento, na diluição 1:1 ER teve uma redução em sua viabilidade não atingindo 50%. RO, AP e IR foram estatisticamente semelhantes. Em ordem decrescente apresentou-se AH > RE > EM > ER. Na diluição 1:2 ER manteve-se com a menor taxa de sobrevivência celular. IR, AP e RE foram semelhantes entre si. Na diluição 1:4 RO e AH foram semelhantes estatisticamente entre si e apresentaram a viabilidade próxima ao grupo controle. Já IR, AP e RE não obtiveram diferenças estatisticamente. Em ordem decrescente apresentaram-se

RO=AH >RE=AP=IR>EM>ER. Endorez continuou com uma sobrevivência celular inferior a 50%. Na diluição 1:8 IR e EM não apresentaram diferenças estatística. RO e AH demonstraram ser os que mantiveram a viabilidade celular alta. RO~AH>AP>IR=EM>RE>ER.

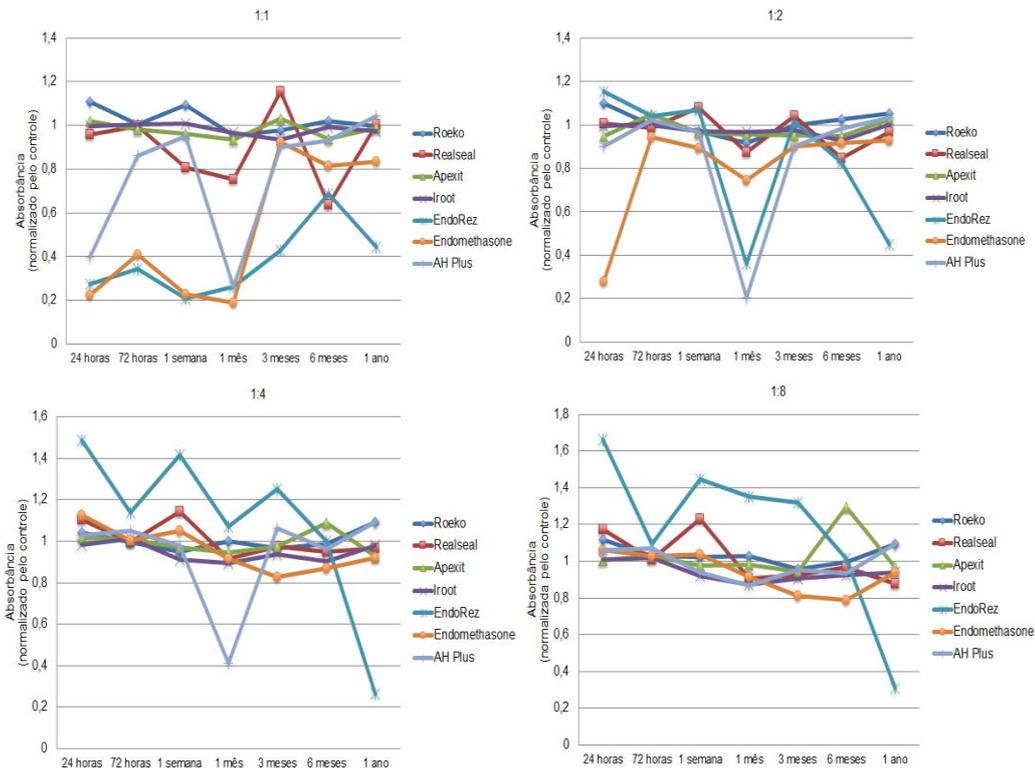


Figura 23 – Gráficos de linhas da absorbância normalizada pelo grupo controle, de acordo com o tempo de avaliação da citotoxicidade dos cimentos, nas diluições 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8.

5.2 Teste de genotoxicidade (MNT)

A formação de micronúcleos pelos cimentos endodônticos foi contada nas culturas de células V79, expostas às diluições dos cimentos testados. Os micronúcleos foram identificados como estruturas contendo DNA no citoplasma, separado do núcleo principal com estrutura da cromatina similar e intensidade de cor

semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal, borda evidente, sugerindo membrana nuclear, formato arredondado, com localização intracitoplasmática e de diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal (Figura 24). Apenas células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas, e as células em mitose (Figuras 29 e 30) e aquelas exibindo fragmentação nuclear por apoptose (Figuras 26 e 27) também foram contadas.

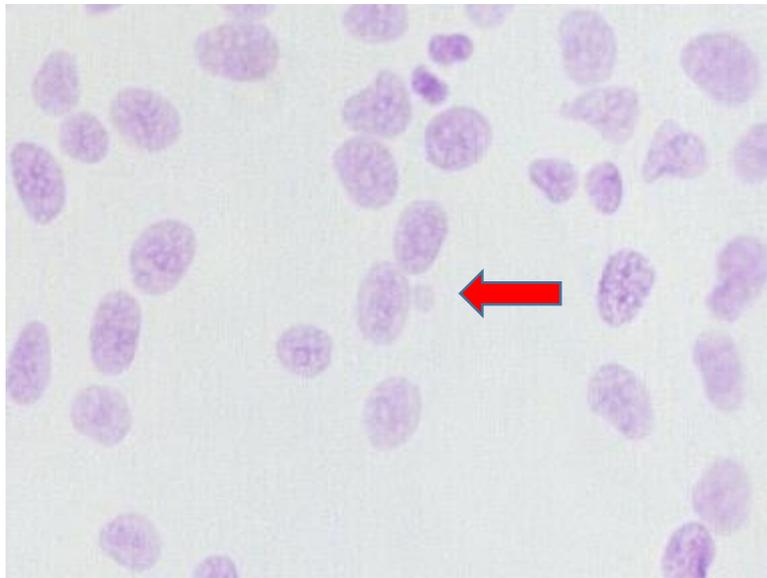


Figura 24 - Formação de micronúcleo em células V79 após o tratamento com Apexit Plus na diluição 1:8 após 1 ano; a seta indica micronúcleo de células contadas (aumento de 100x).

Foi utilizada a diluição 1:8, pois somente a partir desta diluição houve viabilidade celular próxima a 50%, determinada pelo teste de XTT para todos os sete cimentos endodônticos testados. As diluições mais citotóxicas foram descartadas, pois não permitiram proliferação celular ou causaram apoptose das células existentes.

Tabela 1 - Formação de micronúcleos pelo contato das culturas celulares com extratos dos materiais sobre células V79, expressos em micronúcleos por 100 células, indicando os valores das médias, o mínimo e máximo

	Média	Mínimo	Máximo
Controle Negativo	1,5	1	2
Roeko Seal 24 horas	16	15	17
Roeko Seal 1 ano	12	10	14
Real Seal 24 horas	7	3	11
Real Seal 1 ano	3,5	1	6
Apexit Plus 24 horas	7,5	3	12
Apexit Plus 1 ano	5,5	3	9
Iroot SP 24 horas	1,5	1	2
Iroot SP 1 ano	8,5	6	11
Endo Rez 24 horas	9,5	5	14
Endo Rez 1 ano	17,5	17	18
Endomethasone N 24 hor	3,5	3	4
Endomethasone N 1 ano	2	1	3
AH Plus 24 horas	6,5	5	8
AH Plus 1 ano	5,5	4	7
EMS	31,5	31	32

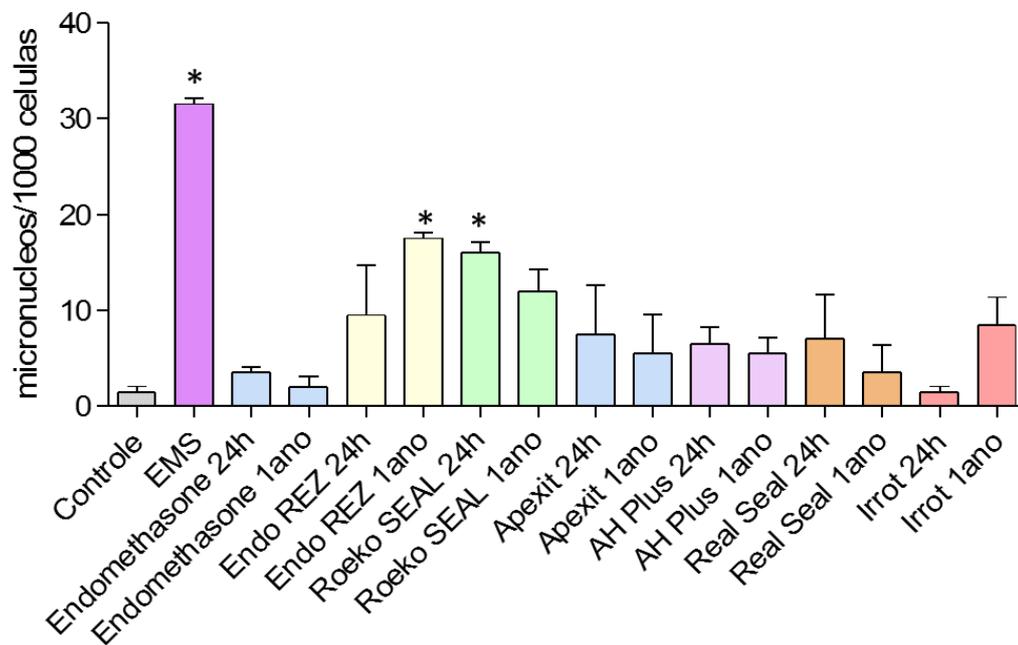


Figura 25 – Indução de Micronúcleo em células V79 após a exposição a diluição 1:8 nos tempos de 24 h e 1 ano de endurecimento os sete cimentos analisados. As barras representam as medianas dos números de micronúcleos que foram calculados em relação ao controle negativo. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle negativo e os grupos tratados são indicados com asteriscos.

O EMS foi utilizado como controle positivo, sendo capaz de aumentar o número de micronúcleos em mais de 30% em relação ao controle negativo. Verifica-se também que o EndoRez (1 ano) e o Roeko Seal (24 h) foram capazes de aumentar o número de micronúcleos em quase 20% assemelhando-se ao grupo controle positivo EMS, sendo os mais genotóxicos. Em relação ao controle negativo os cimentos Endomethasone (1 ano) e Iroot (24 h) foram os que induziram poucos micronúcleos e portanto mantiveram-se menos genotóxicos.

5.2.1 Apoptose

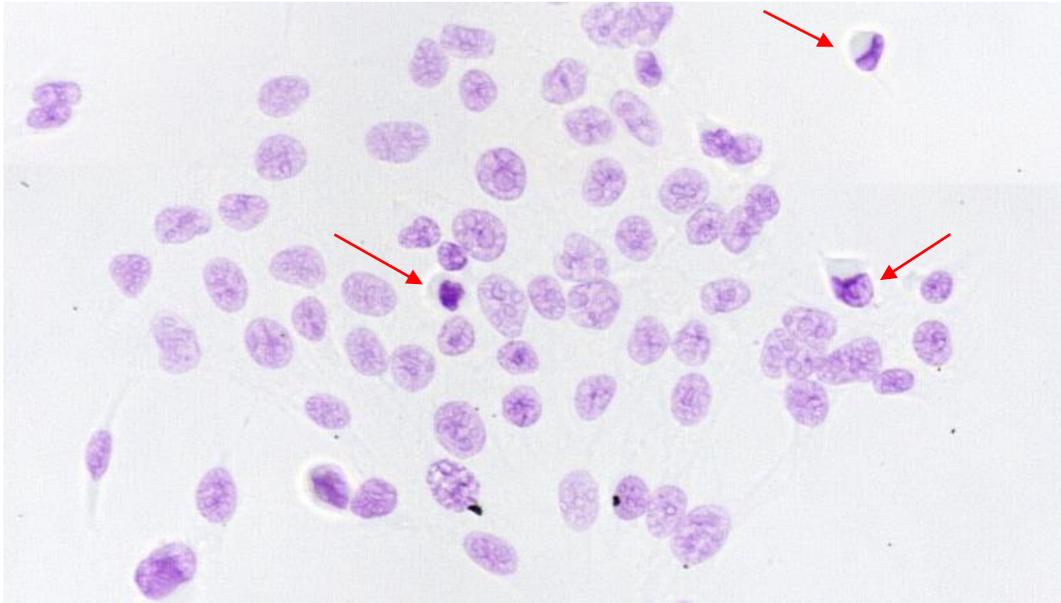


Figura 26 - Células V79 em apoptose após o tratamento com Endomethasone N na diluição 1:8 após 24 h de endurecimento; as setas indicam células em apoptose (aumento de 100x).

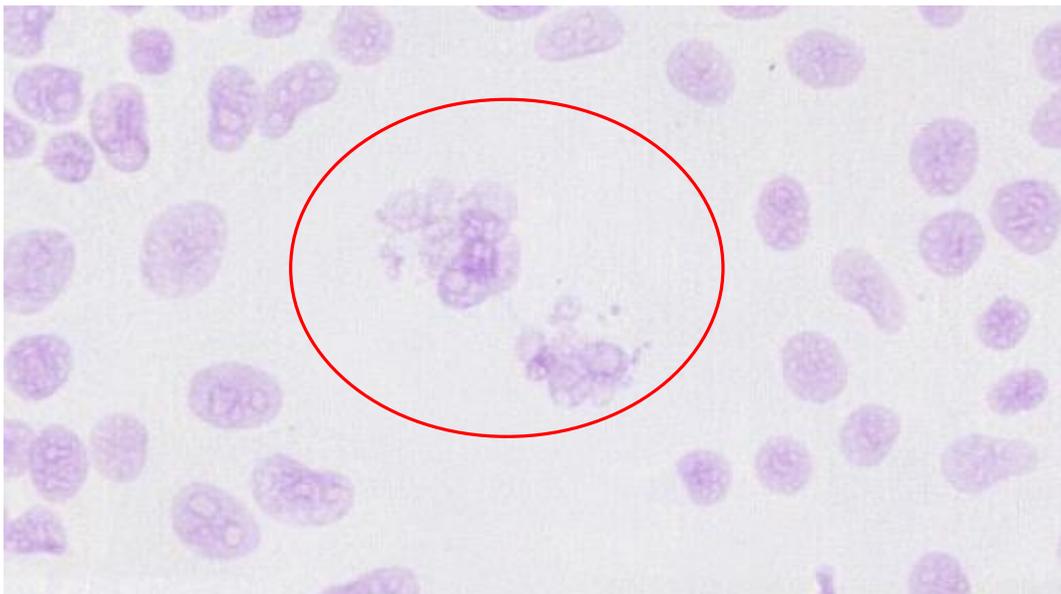


Figura 27 - Células V79 em apoptose desconfigurando o formado mononuclear das células contáveis. (aumento 100X).

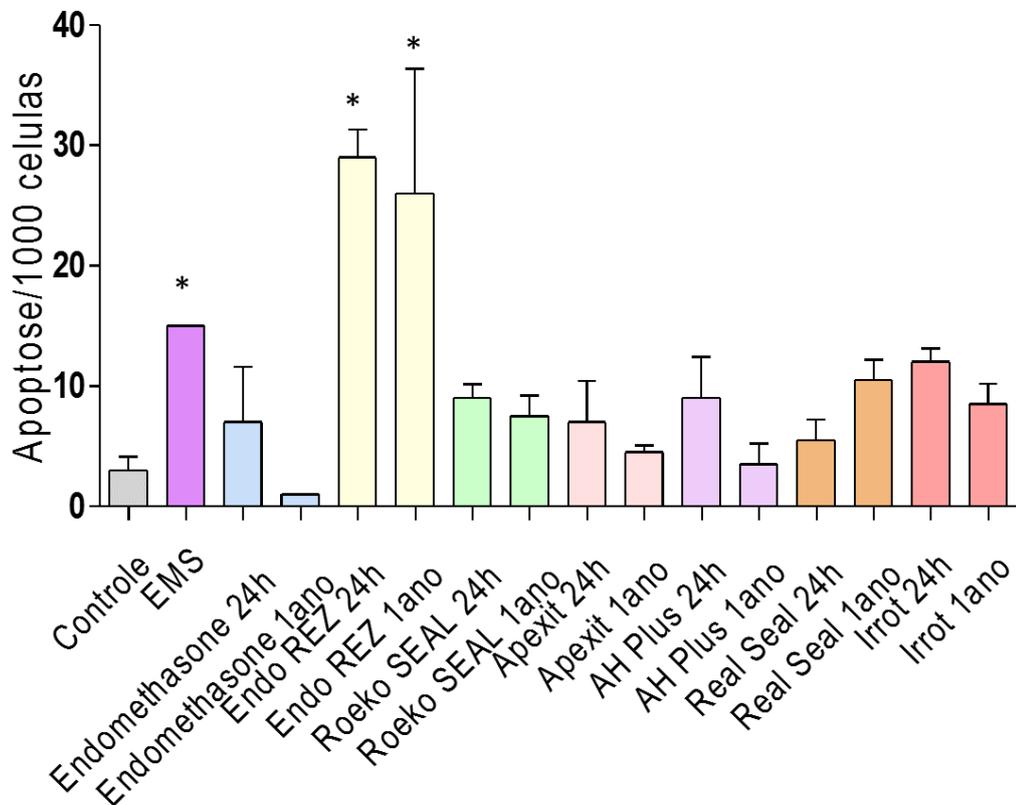


Figura 28 – Número de células V 79 em apoptose, após a exposição a diluição 1:8 nos tempos de 24 h e 1 ano de endurecimento os sete cimentos analisados. As barras representam as medianas dos números de apoptoses que foram calculados em relação ao controle negativo. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle negativo e os grupos tratados são indicados com asteriscos.

Em relação ao grupo controle negativo, somente Endomethasone N (1 ano) teve um menor número de apoptoses, mostrando-se pouco genotóxico. Em relação ao grupo controle positivo somente EndoRez tanto no período de 24 h como após 1 ano de endurecimento apresentou um número maior de apoptoses, demonstrando ser um cimento bem genotóxico nesta diluição. Todos os outros cimentos e seus respectivos períodos ficaram a baixo do controle positivo EMS.

5.2.2 Mitose

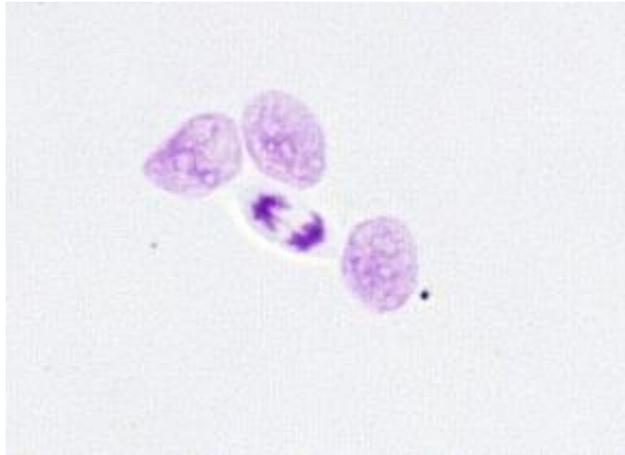


Figura 29 - Célula representativa na fase de anáfase durante a mitose no processo de divisão celular.

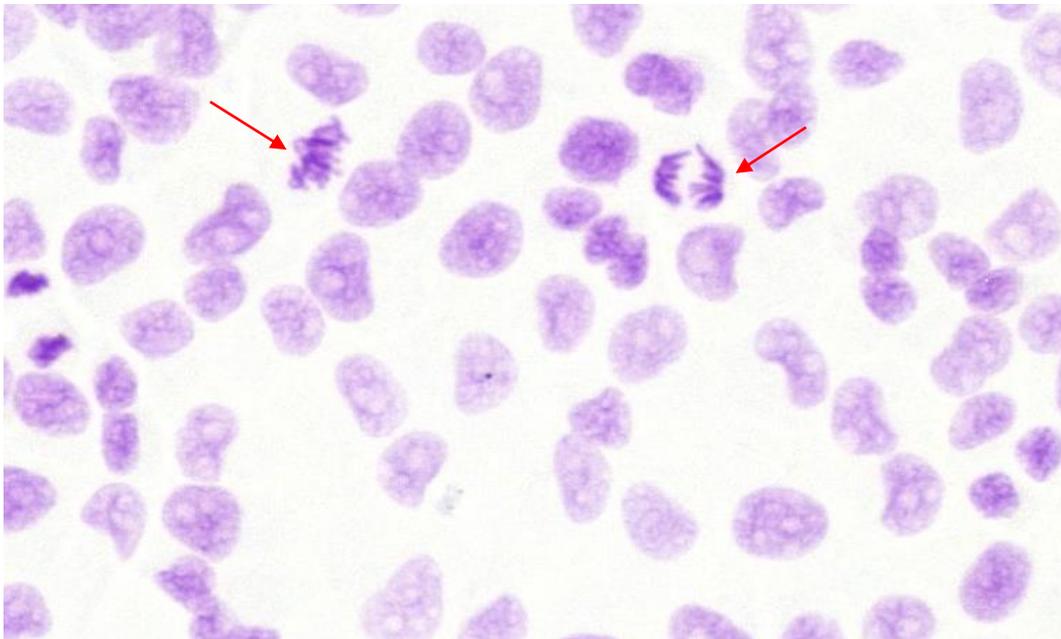


Figura 30 - Células V79 na fase de mitose após o tratamento com Endomethasone N na diluição 1:8 após 1 ano de endurecimento; as setas indicam células em mitose (aumento de 100x).

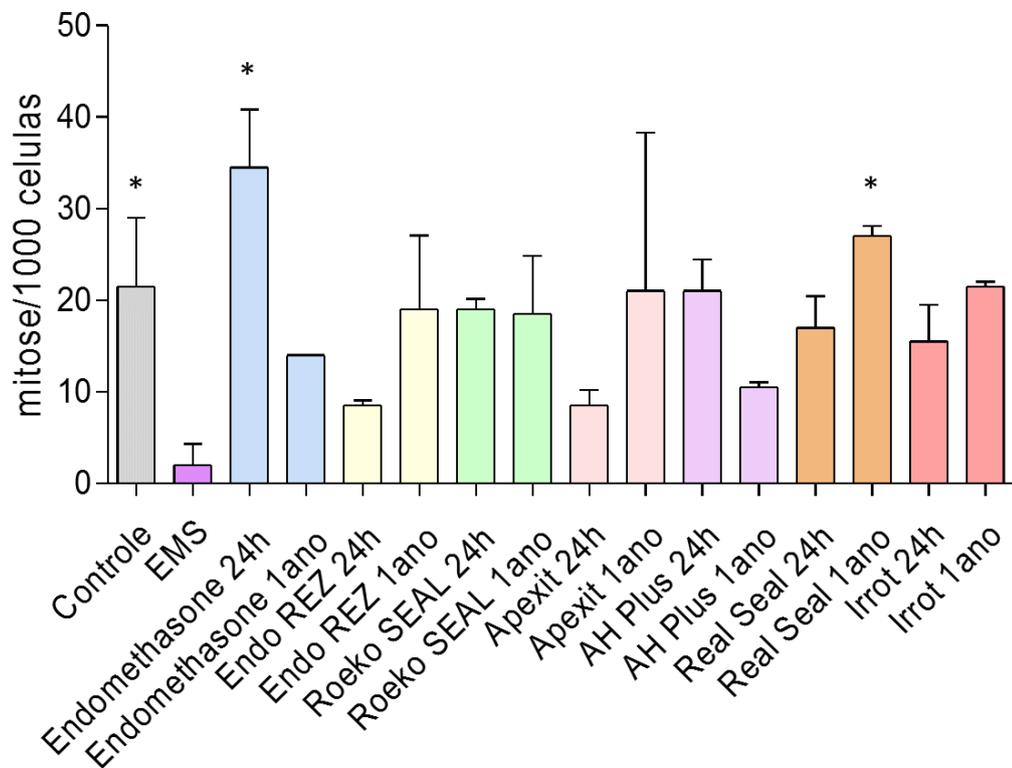


Figura 31 – Número de células V 79 em mitose, após a exposição a diluição 1:8 nos tempos de 24 h e 1 ano de endurecimento os sete cimentos analisados. As barras representam as medianas dos números de apoptoses que foram calculados em relação ao controle negativo. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle positivo (EMS) e os grupos tratados são indicados com asteriscos.

Os cimentos Endomethasone N (24 h) e o Real Seal (1 ano) apresentaram um número de mitoses superior ao grupo controle negativo, evidenciando que suas células estão em recuperação em relação ao processo de divisão celular. Além dos cimentos citados, os outros cimentos também permitiram uma constante duplicação de suas células.

Tabela 2 - Teste de Dunn (5%) para a diluição 1:8 de todos os cimentos endodônticos

		Grupos Homogêneos									
Materiais	Tempo	Micronúcleo			Apoptose			Mitose			
EMS		A			A	B				C	
EndoRez	24H	A	B	C	A				A	B	C
	1 ANO	A			A				A	B	C
Roeko Seal	24H	A	B		A	B	C		A	B	C
	1 ANO	A	B	C	A	B	C		A	B	C
iRoot SP	24H			C	A	B	C		A	B	C
	1 ANO	A	B	C	A	B	C		A	B	C
Real Seal	24H	A	B	C	A	B	C		A	B	C
	1 ANO	A	B	C	A	B	C		A	B	C
Apexit Plus	24H	A	B	C	A	B	C			B	C
	1 ANO	A	B	C	A	B	C		A	B	
Endomethasone	24H	A	B	C	A	B	C		A		
	1 ANO		B	C			C		A	B	C
AH Plus	24H	A	B	C	A	C	C		A	B	C
	1 ANO	A	B	C		C	C		A	B	C
Controle Negativo				C		B	C		A	B	C

5.3 Teste de “push-out”

Os resultados obtidos da análise de resistência adesiva foram realizados na máquina de ensaio universal EMIC modelo DI-1000 e os valores expressos em MPa (Figuras 26-32).

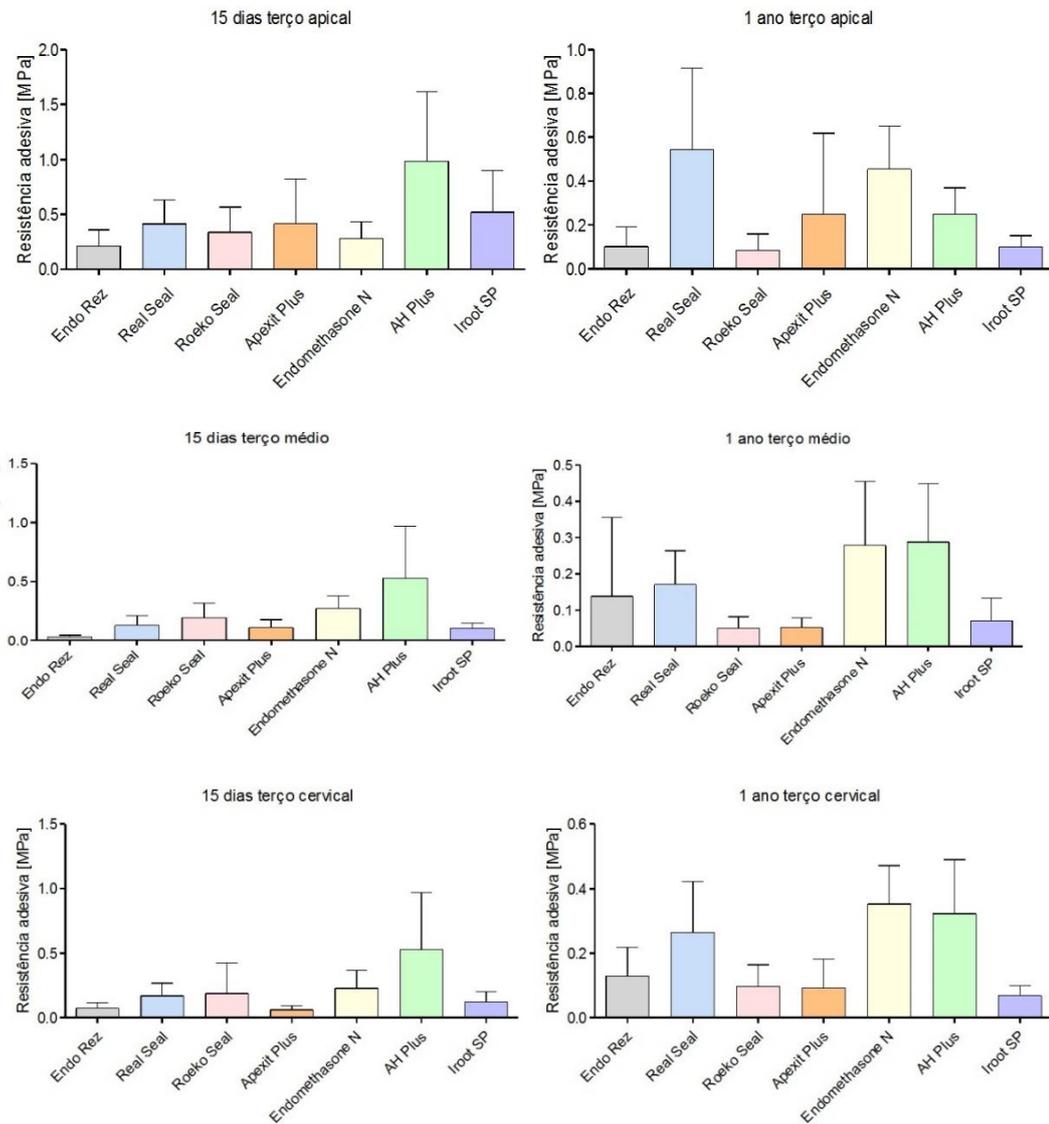


Figura 32 - Resistência adesiva em MPa dos cimentos endodônticos avaliados nos terços apical, médio e cervical, durante 15 dias e 1 ano.

No terço apical, após 15 dias, IR, RE, RO, AP e EM não apresentaram diferenças estatísticas. AH obteve a melhor resistência adesiva e o ER foi o cimento que apresentou a menor resistência. Após 1 ano, AH e AP não apresentaram diferenças estatísticas, assim como ER, IR e RO. EM e RE não apresentaram diferença estatística e foram os que apresentaram maior resistência adesiva. RO foi o cimento que apresentou

menor valor de resistência de união. Comparando o desempenho dos cimentos separadamente após 15 dias e 1 ano, verifica-se que ER, IR e RO apresentaram as menores médias de resistência adesiva após 1 ano, e juntos foram os cimentos com menor aderência as paredes dentinárias. RE apresentou uma melhora em sua resistência após 1 ano de avaliação. O AP teve um decréscimo em sua média de valor da adesividade. EM teve uma melhora nos níveis de resistência após 1 ano. E AH teve um decréscimo na sua resistência adesiva.

No terço médio, após 15 dias EM, AH e RO não apresentaram diferenças estatisticamente. ER foi o que apresentou menor resistência adesiva. Na avaliação após 1 ano, AH e EM não possuem diferenças estatísticas, assim como o grupo RE e ER entre si. Os grupos IR, RO e AP também não apresentaram resultados estatisticamente diferentes. Na comparação entre os cimentos pode-se observar que ER teve uma melhora em sua resistência adesiva similar ao RE. RO teve valores mais baixos após 1 ano, assim como AP e IR. EM não diferenciou em seus valores de resistência. O AH obteve redução nos valores significativamente após 1 ano de avaliação.

No terço cervical, após 15 dias RE, RO e IR não tiveram diferenças estatísticas. AH obteve os melhores valores de resistência enquanto que AP apresentou os menores valores de resistência adesiva. Após 1 ano, RE e ER foram estatisticamente semelhantes, assim como nos grupos EM e AH e nos grupos RO, AP e IR. Na comparação entre os diferentes grupos após 15 dias e 1 ano, AH, EM, IR e RO tiveram valores de médias inferiores após 1 ano. AP, ER e RE obtiveram valores de médias superiores ao longo de 1 ano.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da metodologia

A compatibilidade biológica dos cimentos é de extrema importância na terapia endodôntica, uma vez que estes materiais frequentemente estão em contato com os tecidos periapicais por longos períodos. A resposta biológica dos tecidos a esses materiais pode influenciar o resultado final do tratamento endodôntico (Waltimo et al., 2001). Um cimento endodôntico não deve dificultar a reparação dos tecidos, mas ajudar ou estimular a reorganização das estruturas lesadas.

Para testar a biocompatibilidade dos diferentes cimentos endodônticos, vários métodos de pesquisa têm sido utilizados, podendo ser eles *in vitro* ou *in vivo*. O teste de citotoxicidade *in vitro* para analisar a viabilidade ou sobrevivência celular vem sendo empregado, pois permite o emprego de tipos e linhagens celulares relevantes, usando condições simples, controladas, reproduzíveis e em conformidade com os princípios bioéticos (Scelza et al., 2012). Estudos de cultura celular fornecem informações toxicológicas em um sistema simplificado que minimiza o efeito de variáveis externas, que muitas vezes representam problemas significativos durante a realização de experimentos *in vivo* (Mukhtar-Fayyad, 2011).

Os testes *in vitro* são mais rápidos e mais baratos do que os *in vivo*, mas tem sido criticado por sua baixa relevância clínica, provavelmente por utilizarem avaliações de curto prazo, sendo insuficientes para prever as respostas biológicas dos materiais que permanecem em contato direto com os tecidos perirradiculares por anos ou décadas

(Schwarze et al., 2002a; Brackett et al., 2010). Por isso, este estudo utilizou um intervalo de tempo maior, até um ano de avaliação, para melhor simular as condições clínicas, usando o “envelhecimento” dos materiais pelo método *in vitro*.

Entretanto, precisa ser esclarecido que é extremamente importante para a análise biológica dos materiais endodônticos combinar os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* para entender os efeitos dos cimentos na região dos tecidos apicais.

Neste estudo foram utilizados dois experimentos *in vitro*, a citotoxicidade sobre fibroblastos do ligamento periodontal (PDLF) por meio do teste de XTT, para análise da sobrevivência celular e a genotoxicidade sobre fibroblastos de hamster chinês (V79) pela formação de micronúcleos durante a fase de mitose do ciclo celular, para detecção de mutações cromossômicas e apoptoses.

Os fibroblastos são as células mais utilizadas para o estabelecimento de linhagens de células permanentes, pois são estáveis, com características biológicas bem definidas e podem ser obtidas a partir de cultura celular (Schuster et al., 2001; Galler et al., 2006).

No estudo de genotoxicidade optou-se pela utilização de fibroblastos de hamster chinês (V79), por serem células com uma proliferação mais rápida, já que seria necessário um alto número de células para o teste de micronúcleos. Foram utilizados fibroblastos que pertencem a uma linhagem de células previamente estabelecidas e estão disponíveis comercialmente. Estas células são comumente utilizadas em análise do comportamento biológico dos materiais dentários (Tai et al., 2002; Camargo et al., 2009; Silva GO, 2011; Bin CV, 2011).

Na literatura diversos estudos (Zhang et al., 2010; Karapınar-Kazandag et al., 2011; Mukhtar-Fayyad, 2011; Bin CV, 2011; Silva GO, 2011; Camargo et al., 2014) e no presente estudo utilizou-se extratos obtidos a partir dos cimentos nas diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, a fim de que se possa mensurar as substâncias liberadas pelos materiais durante

os diferentes tempos de endurecimento (24 h, 72 h, 1 semana, 1 mês, 3 meses, 6 meses e 1 ano). Depois dos cimentos endodônticos endurecerem, ainda é possível que componentes tóxicos possam ser liberados destes materiais por longos períodos de tempo (Bin CV, 2011; Silva GO, 2011; Camargo et al., 2009, 2014).

Quanto aos testes de citotoxicidade existem vários métodos de análise *in vitro*, como o Cristal Violeta, Azul de Tripán, MTT, MTS e XTT. O ensaio com o MTT ([3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)] -2,5-difenil brometo de succinato) vem sendo utilizado em larga escala por diversos autores (Schwarze et al., 2002a; Lodiene et al., 2008; Brackett et al., 2010; Zhang et al., 2010; Mukhtar-Fayyad, 2011; Ashraf et al., 2012) como teste de escolha em cultura de células, pois avalia a atividade metabólica mitocondrial celular, não apenas fazendo uma classificação de célula viva ou morta. Neste estudo utilizou-se o corante XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamnocarbonil-tetrazolium), de coloração alaranjada por ser uma evolução ao teste MTT, pois além de ser extremamente confiável, e facilmente reproduzível, reflete não somente o número de células em uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, pois baseia-se na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase; elimina o uso de timidina, um material radioativo, fornece resultados mais rápidos sem a necessidade de utilizar-se medidas de estabilização das células estudadas e é um teste recomendado para ensaios de alto rendimento, reduzindo a perda de células e também de variação no resultado celular .

Os sais de tetrazolium, componentes ativos dos corantes MTT, MTS e XTT são utilizados para distinguir as células vivas das células mortas. Eles são reduzidos a formazana pelo sistema de citocromo das células vivas e a cor resultante é uma medida direta da viabilidade celular. As formazanas são excessivamente insolúveis em água e na tentativa de driblar este inconveniente, foram desenvolvidos os derivados de MTT, os corantes XTT e MTS que produzem formazanas mais intensamente

coloridas e solúveis em água, facilitando a leitura em espectrofotômetro.

Existem muitos estudos na literatura que avaliam a citotoxicidade dos cimentos obturadores, mas poucos trabalhos verificam o dano causado ao DNA celular. Os testes de genotoxicidade são importantes na pesquisa na avaliação do potencial carcinogênico que alguns componentes desses cimentos possam apresentar (Chang et al., 1998; Ribeiro et al., 2005; Ribeiro, 2008).

Neste estudo a avaliação dos efeitos genotóxicos dos materiais foi medido pelo teste MNT, verificando a formação de micronúcleos, que é utilizado na detecção de mutações cromossômicas durante a mitose no processo de divisão celular (Ribeiro, 2008), também foram contadas as células em apoptose e o número de células em mitose.

O micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmento de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose (Rieger, Green, 1968; Schmid, 1975; Ramirez, Saldanha, 2002). Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais (Rieger, Green, 1968) ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase. Os MNs podem ser únicos ou múltiplos e segundo Tolbert et al., 1992 devem preencher os seguintes critérios: 1. Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal; 2. Borda evidente, sugerindo membrana nuclear; 3. Ter formato arredondado; 4. Localização intracitoplasmática; 5. Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal. Uma desvantagem do teste de genotoxicidade in vitro baseia-se em não serem levadas em conta a capacidade da resposta imunológica do organismo quando da exposição a esses cimentos endodônticos (Schweickl et al., 2005), portanto a expressão do efeito genotóxico dos cimentos testados devem ser cuidadosamente analisados.

Além dos testes biológicos, é imprescindível fazer um paralelo em relação as propriedades físicas destes cimentos endodônticos.

A adesão de cimentos foi estudada sobre a base de um modelo experimental simples proposta por Grossman em 1976 e melhorada por Orstavik et al, 1983, que introduziu o uso de uma máquina universal de ensaios á normalização dos testes e assim produziu resultados mais precisos.

A força adesiva de cimentos endodônticos pode ser avaliada por vários métodos, que incluem a resistência ao cisalhamento, microtração e força push-out (Ersahan, Aydin, 2010). Neste estudo utilizou-se o teste de Push-out que mede a resistência adesiva do cimento ás paredes do canal radicular. A adesão de cimentos endodônticos à dentina do canal radicular tem sido regularmente avaliada por testes push-out (Stiegemeier et al., 2010; Costa et al., 2010; Ersahan, Aydin, 2010; Ahmad et al., 2013; Guiotti et al., 2014). Este teste é facilmente realizado e interpretado, e fornece uma avaliação realista da resistência de união do cimento á dentina, mesmo em níveis baixos de união (Ersahan, Aydin, 2010). No entanto, a distribuição não uniforme e a tendência de o material se deformar quando uma carga compressiva é aplicada durante o teste é uma grande desvantagem do teste de push-out. Afim de superar estas limitações, este estudo adotou o método proposto por Sousa-Neto et al, 2005), em que o cimento é testado em contato com a dentina do canal radicular, permitindo que este se adapte à forma do canal e penetre nos túbulos dentinários. Para melhorar a análise da adesão do cimento ás paredes do canal, foram realizados cortes nos terços cervical, médio e apical, a fim de se obter fatias finas (Sousa-Neto et al., 2005; Ersahan, Aydin, 2010; Stiegemeier et al., 2010; Guiotti et al., 2014).

Para simular melhor a situação clínica dos cimentos dentro do canal radicular, os cimentos foram colocados juntamente com cone de guta-percha, realizando um selamento hermético por todo o sistema de canais radiculares. Estes cimentos foram deixados por um período de um ano a fim de se estudar se estes cimentos endodônticos mantêm suas características de vedamento por toda superfície interna da raiz.

6.2 Discussão dos resultados

Na avaliação da citotoxicidade dos sete cimentos, RoeKo Seal, Apexit Plus e Iroot SP, não apresentaram diferenças significantes entre as diluições e nos períodos analisados, não apresentando citotoxicidade sobre as células PDLF, mantendo um excelente padrão de sobrevivência celular, sem diferença significativa comparado ao grupo controle.

Iroot SP é um cimento biocerâmico, pré-misturado, de uso injetável. Segundo seu fabricante é insolúvel, radiopaco, com excelentes propriedades físicas e químicas. Não sofre encolhimento durante seu endurecimento, biocompatível e de excelente vedação. Os resultados obtidos neste estudo em relação ao cimento Iroot SP concordam com os de Zhang et al. (2010) que comparando este cimento com o AH plus sobre a expressão de genes relacionados com a mineralização de osteoblastos MG63, incluindo colagênio do tipo I (COL I), osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN), nos dias 1, 3 e 6. Verificou que no ensaio de MTT, os extratos não diluídas de iRoot SP não foram citotóxicos, enquanto que os extratos não diluídos de AH Plus foram classificados como ligeiramente citotóxico. O iRoot SP regulou COL I, OCN, e BSP na expressão do RNA mensageiro após 3 e 6 dias. No experimento de ensaio imunoenzimático ligado a enzimas, o iRoot SP aumentou COL I e os níveis de proteína BSP em comparação com AH Plus o grupo controle no sexto dia. Com base nestes resultados, os autores não verificaram qualquer citotoxicidade deste cimento nas diluições 1:1, 1:2 e 1:4, então pode ser considerado como um material favorável a interação com o material celular.

Em relação a genotoxicidade deste cimento, o IRoot SP apresentou baixa formação de micronúcleos (1,5 a cada 1000 células) nas primeiras 24 h de análise, mas apresentou um maior número após 1 ano

(média de 8,5), o que não compromete a sua baixa toxicidade em relação aos outros cimentos analisados. A resistência adesiva do Iroot SP mostrou ser satisfatória nos 15 dias iniciais no terço apical, mas apresentou diminuição ao longo de 1 ano. Ainda nos terços médio e cervical houve pouca adesão a dentina das paredes do canal radicular, demonstrando ser pouco eficiente na vedação apical, o que vem em desacordo com as indicações do fabricante. Mas ainda são necessários outros estudos quanto a sua propriedade físico-química para poder concluir sobre este aspecto estudado.

Roeko Seal, um cimento a base de silicone, e que segundo o fabricante é extremamente biocompatível, expande-se ligeiramente (0,2%), com ótima aderência mecânica da parede do canal, devido à expansão e porque não contém eugenol. Neste estudo não apresentou citotoxicidade sobre as células PDLF em nenhum dos períodos e diluições testadas. Estes resultados são semelhantes aos de Karapınar-Kazandag et al. (2011) em que avaliaram os cimentos AH Plus, RoekoSeal, EndoREZ, Epiphany e Activ GP sobre fibroblastos de rato L929 e células pulpares humanas primárias. Os extratos das amostras foram colocados em contato com as células nos tempos 1, 4 e 7 dias. Após foi realizada a filtração dos extratos e diluídos em 50% e 25%. Os extratos diluídos foram incubados com as células cultivadas durante 24 h e 72 h. Os extratos diluídos de Activ GP e Epiphany foram geralmente menos tóxico do que os não diluídos. Nenhuma ou mínima citotoxicidade foi observada com RoekoSeal, AH Plus e EndoREZ. Os cimentos exibiram vários graus de citotoxicidade dependente de sua composição química.

Ainda, Silva EJNL et al. (2013), investigou os efeitos de oito cimentos endodônticos sobre a citotoxicidade de células de fibroblastos Balb/c 3T3 durante 5 semanas. Utilizaram os cimentos AH Plus, Epiphany, Endomethasone N, EndoREZ, MTA Fillapex, Pulp Canal Sealer EWT, Roeko Seal e Sealapex. O Roeko Seal foi o único cimento que não demonstrou quaisquer efeitos citotóxicos em qualquer tempo. Todos

os outros cimentos exibiram toxicidade grave inicialmente (semana 0). Este resultado concorda com os encontrados neste estudo. Portanto, RoekoSeal teve nenhum efeito citotóxico quando comparado com os outros cimentos endodônticos testados.

Em relação a genotoxicidade o Roeko Seal foi capaz de aumentar o número de micronúcleos sobre células V79. Nas primeiras 24 h obteve uma média de (16 micronúcleos a cada 1000 células) e após 1 ano (15 a cada 1000 células). Em relação ao grupo controle positivo EMS (média de 31,5 a cada 1000 células) demonstrou ser genotóxico, já que se manteve como o segundo maior indutor de micronúcleos quando comparado aos outros cimentos avaliados, estando de acordo com Camargo et al. (2014), que avaliando o cimento RekoSeal por teste de cometa, também verificou genotoxicidade para este material. Estes dados mostram que mesmo não apresentando ser citotóxico ele é capaz de gerar algum dano no DNA celular. Há pouco estudo sobre o poder genotóxico deste cimento, sendo necessário estudos complementares para saber qual o mecanismo ou que substâncias liberadas por este cimento podem ocasionar danos ao DNA celular.

Ao teste físico de push-out, Roeko Seal apresentou uma baixa resistência adesiva as paredes dentinárias do canal radicular, nos terços apical médio e cervical, tanto nas análises de 15 dias como nas de 1 ano. Provavelmente por se tratar de um cimento a base de silicone, é elástico e pode assim se desprender das paredes do canal radicular. Estes resultados talvez tenham como razão sua característica borracheide por ser à base de silicone, o que macroscopicamente é perceptível quando sondado com um explorador.

Em relação ao cimento Apexit Plus, os resultados deste estudo foram semelhantes aos de Yilmaz et al. (2012), em que avaliando os cimentos Endomethasone N (En N), e o Apexit Plus (AP) em cultura de células de fibroblastos de rato L929, utilizou extratos dos cimentos nas diluições (1:2,1:4,1:8,1:16 e 1:32), por um período de 1 h, puderam

verificar que o Apexit Plus não mostrou citotoxicidade em qualquer diluição testada.

Apexit Plus obteve baixa taxa de indução de micronúcleos comparado ao controle EMS, apresentando uma média de (7,5 a cada 1000 células) nas 24 h de análise e de 5,5 após 1 ano. Demonstrou ser um cimento pouco genotóxico. Mesmo assim, ainda são necessários outros estudos em relação aos seus componentes. Já em relação a sua propriedade física, no terço apical apresentou melhores resultados de adesão comparados com os terços médio e cervical. Assim demonstra ser um cimento com capacidade de vedação apical.

Endomethasone N é um cimento endodôntico a base de Óxido de Zinco, acetato de hidrocortisona(anti-inflamatório) e Timolodado(Antisséptico), Sulfato de Bário e Estearato de Magnésio. Ao teste de citotoxicidade após 72 h e 1 semana de avaliação na diluição 1:1 apresentou-se severamente citotóxico, conseguindo nas subseqüentes diluições recuperar a viabilidade celular. Em 1 mês na diluição 1:1 manteve-se citotóxico, não apresentou efeito citotóxico na diluição de 1:4 e em 1:2. Quanto a genotoxicidade apresentou uma média de (3,5 micronúcleos a cada 1000 células) em 24 h e de (2 a cada 1000 células) após 1 ano de avaliação, mostrando ser um cimento de baixa citotoxicidade comparado aos demais cimentos analisados. A resitência adesiva após 1 ano de análise demonstrou ter boa adesão as paredes do canal radicular.

O EndoRez é um cimento a base de metacrilato, o UDMA (dimetacrilato de uretano) um agente tóxico, que com sua degradação pode liberar monômeros e partículas resultando na citotoxicidade deste cimento. A presença deste composto e a liberação de monômeros podem explicar a alta citotoxicidade encontrada neste estudo na primeira diluição 1:1 em todos os períodos de avaliação. Mesmo após 3 meses e 6 meses de avaliação ainda se mostra citotóxico na diluição 1:1, mas recupera sua viabilidade conforme diluído. Já no período prolongado de avaliação, 1 ano este cimento apresentou uma queda brusca nos seus valores de

viabilidade, tornando-se exageradamente citotóxico nas quatro diluições. O que pode ser confirmado por Brackett et al. (2012) que numa avaliação durante um ano dos cimentos AH Plus (AHP), Epiphany (EPH), EndoREZ (ER), GuttaFlow (GF), InnoEndo (IN), e Pulp Canal Sealer (PCS), observou que a atividade SDH em células expostas a alguns cimentos melhorou significativamente após 1 ano, mas o ER permaneceu citotóxico. Quando os materiais após 1 ano foram novamente testados, AHP, ER, GF, e IN não apresentaram mudanças. EPH e PCS foram mais tóxicos.

Nas primeiras 24 h com exceção do EndoRez nas diluições 1:1 e do Endomethasone N 1:1 e 1:2, todos os outros cimentos mantiveram a viabilidade celular próxima do grupo controle, demonstrando não serem citotóxicos nas primeiras horas após seu endurecimento. Estes resultados concordam com os obtidos por Lodiene et al. (2008), onde os autores verificaram que tanto o AH Plus quanto o Roeko Seal não se mostraram citotóxicos nas primeiras 24 h. Já em relação ao EndoRez os autores não verificaram toxicidade em 24 h e neste estudo foi verificada somente na diluição 1:1 deixando de ser citotóxico conforme o aumento da sua diluição.

Já após 72 h e 1 semana de avaliação os cimentos EndoRez e Endomethasone N na diluição 1:1 apresentaram-se severamente citotóxicos, conseguindo nas subseqüentes diluições recuperar a viabilidade celular. Em 1 mês na diluição 1:1 tanto EndoRez como Endomethasone N mantiveram-se citotóxicos, mas ER não conseguiu na diluição 1:2 recuperar a viabilidade das células PDLF.

AH Plus é um cimento que contém resina epóxi (pasta A) e aminas (pasta B). Na avaliação de 1 mês o cimento AH Plus teve um comportamento diferente dos outros, pois foi severamente citotóxico nas diluições 1:1, 1:2 e 1:4. Somente na diluição 1:8 ele começa a permitir o aumento da sobrevivência das células, provavelmente devido a liberação tardia de formaldeído presente em sua composição (Leonardo et al., 1999, Merdad et al., 2007).

Brackett et al. (2010) também comprovaram sua citotoxicidade, quando avaliaram *in vitro* cinco cimentos endodônticos durante 12 semanas usando três linhagens de células: fibroblastos de rato L929, células osteoblásticas de rato (ROS) 17/2.8, e osteoblastos de rato MC3T3-E1. Foram utilizados o AH plus (AHP), duas versões de Endo Rez (ER, e Rx), Epiphany (EPH) e Pulp Canal Sealer (PCS). Inicialmente, todos os cimentos suprimiram a atividade SDH de fibroblastos L929. Depois de 12 semanas de imersão em solução salina, AHP exibiu a atividade SDH acima de Tf (120%), seguido por Rx (78%), ER (58%), PCS (38%), e EPH (28%), todos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Em geral, as três linhas celulares responderam de forma semelhante para os cimentos. No entanto, AHP causou respostas únicas: células ROS foram inicialmente menos sensível, e AHP foi severamente citotóxica para células MC3T3 (<35% de Tf) ao longo de 8 semanas. Os dados sugerem que o "envelhecimento", em solução salina, dos cimentos endodônticos atuais diminuem a citotoxicidade destes em diferentes períodos.

Ainda de acordo com os resultados deste estudo, Ashraf et al. (2012), avaliaram a citotoxicidade de três cimentos à base de resina, ou seja, AH Plus, EndoREZ e Epiphany em células L929. Os cimentos foram divididos em dois grupos, puro e diluído. As diluições dos materiais foram preparadas separadamente e foram incubados com fibroblastos L929, nos períodos de 1 h, 24 h e 72 h. Após 24 h, todos os materiais foram significativamente mais citotóxicos do que o grupo controle negativo, e foram menos citotóxicos do que o grupo controle positivo. Após 72 h, as amostras puras e as diluições de todos os materiais foram tão citotóxicas quanto o grupo controle positivo. Em cada momento, nenhuma diferença significativa foi percebida entre os diferentes materiais em termos de viabilidade celular. Portanto, concluíram que as diferenças observadas entre a citotoxicidade de AH Plus, EndoREZ e Epiphany não atingiram um nível significativo nos períodos comparados.

Real Seal é composto pelo cimento resinoso (a base de resina plástica uretano dimetacrilato). Esse cimento apresenta dupla polimerização e segundo o fabricante formação de uma estrutura em monobloco, com o intuito de formar um sistema de material obturador com mesma natureza química, de forma com que eles possam se aderir e formar um compacto de natureza única, assim os cones, estariam aderidos ao cimento, e estes à parede do canal, formando um compacto inacessível a infiltração, teoricamente, na tentativa de diminuir a infiltração bacteriana e o risco de fratura radicular por aumentar a adesão às paredes de dentina. Porém na literatura os resultados demonstram que o sistema Real Seal é resistente a infiltração, mas não a previne completamente, ou seja, não há essa formação do monobloco.

Em todos os períodos de anteriores a 6 meses o cimento Real Seal demonstra uma alta viabilidade celular, mas na diluição 1:1 em 6 meses houve uma queda da sobrevivência das células PDLF, somente recuperando-se na diluição 1:4. Real Seal não mostrou ser genotóxico nos períodos analisados. Em relação a resistência adesiva após a análise de 1 ano mostrou boa adesão nos terços apical, médio e cervical. Scelza et al. (2012), compararam a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos (Sealapex, Pulp Canal Sealer EWT, ReaSeal e MTA Fillapex) 1 e 7 dias após a preparação dos extratos, assim, todos os cimentos endodônticos tiveram forte citotoxicidade em 24 h. Em um período mais longo (7 dias), a viabilidade para Sealapex teve um aumento significativo e Pulp Canal Sealer alcançou níveis de citocompatibilidade semelhantes aos do grupo controle. A análise de variância indicou uma correlação geral entre a citotoxicidade dos materiais e o tempo após a mistura, com algum grau de dependência no ensaio de viabilidade celular. Todos os materiais tinham altos níveis citotóxicos para células primárias humanas, e em sua maioria de forma dependente do tempo, como mostrado por três diferentes testes de viabilidade celular. Este estudo não apresenta-se de acordo com os resultados verificados para o cimento Real Seal.

Mutoh et al. (2013) com seu estudo em ratos, evidencia a importância de uma complementação do estudo *in vivo*. Eles avaliaram a biocompatibilidade de cimentos endodônticos à base de resina (RCSs) nos tecidos periapicais de ratos. Os ratos foram submetidos a reimplante dentário para reproduzir a resposta dos tecidos periapicais com RCSs. Foram utilizados o cimento resinoso Epiphany SE TM, AH Plus Jet TM, o cimento à base de eugenol (Canals) e um grupo de controle. Observaram uma inflamação leve no tecido periapical no cimento Epiphany e AH Plus Jet no sétimo dia, enquanto o cimento Canals induziu uma inflamação severa a moderada. As análises estatísticas mostraram que foram observadas diferenças significativas entre Canals e os outros grupos no dia 7 sobre a resposta inflamatória. No dia 14, as lesões induzidas por todos os selantes foram curadas e predominantemente substituído por tecido conjuntivo fibroso. Os resultados sugerem que Epiphany SE e AH Plus Jet são bons materiais biocompatíveis.

Por fim, os resultados apresentados neste estudo estão compatíveis com os encontrados na literatura até o momento. Por ser um estudo de um longo período de avaliação (1 ano), vem a acrescentar dados relevantes em relação ao comportamento biológico e físico dos cimentos endodônticos. Ainda existem poucos trabalhos na literatura em que a análise seja prolongada, sendo necessário mais estudos em relação ao comportamento destes materiais, já que estes permanecem em contato com os tecidos apicais por anos ou décadas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada pode-se concluir que:

- a) IRroot SP não apresentou citotoxicidade em células PDLF em nenhum dos períodos, baixa formação de micronúcleos e a resistência adesiva mostrou ser satisfatória;
- b) Roeko Seal não foi citotóxico sobre as células PDLF em nenhum dos períodos e diluições testadas, foi genotóxico, e apresentou uma baixa resistência adesiva em todos os terços e períodos de análise;
- c) Apexit Plus não mostrou citotoxicidade em qualquer diluição testada, pouco genotóxico, e no terço apical apresentou melhores resultados de adesão comparados com os terços médio e cervical;
- d) EndoRez mostrou ser citotóxico em todos os períodos de avaliação, assim como genotóxico, pouca adesão as paredes dentinárias;
- e) Endomethasone N apresentou-se severamente citotóxico nos períodos iniciais e deixou de ser citotóxico; não apresentou genotoxicidade e apresentou boa resistência adesiva após 1 ano;
- f) AH plus não foi citotóxico antes de 1 mês de avaliação, mas apresentou alta citotoxicidade neste período, normalizou nos períodos seguintes, não

mostrou ser genotóxico e obteve ótima resistência adesiva tanto em 15 dias como em 1 ano, em todos terços de análise;

g) Real Seal não apresentou-se nem citotóxico, nem genotóxico, quanto a resistência adesiva foi satisfatória após 1 ano em todos os terços.

8 REFERÊNCIAS*

Ahmad M, Alison J, Qualtrough E, David C. The effect of smear layer on the push out bond strength of root canal calcium silicate cements. *Dent Mater*. 2013;29(7):797-803.

American Society for Testing and Materials: Annual Book of Standards. USA: ASTM International; 2007.

Andrighetti-Fröhner CR, Kratz JM, Antonio RV. In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutation Res*. 2006;603(1):97-103.

Ashraf H, Mohammad NM, Mozayeni A, Dianat O, Faranak Mr, Zahra Y. Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9(5):549-53.

Bernath M, Szabo J. Tissue reaction initiated by different sealers. *Int Endod J*. 2003;36(4):256-61.

Bernardo RT, Obici AC, Sinhoreti MAC. Efeito da ativação química ou dual na microdureza Knoop de cimentos resinosos. *Cienc Odontol Bras*. 2008;11(4):80-5.

Bhat SS, Hegde SK, Rao A, Shaji Mohammed AK. Evaluation of resistance of teeth subjected to fracture after endodontic treatment using different canal sealers. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2012;30(4):305-9.

Bin CV. Citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos endodônticos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c 2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod*. 2006;32(10):989-92.

Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int Endod J*. 2008;41(12):1072-78.

Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, et al. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;91(2):839-44.

Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, Bouillaguet S, et al. Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;95(2):380-6.

Brackett MG, Lewis JB, Kious AR, Messer Regina LW, Lockwood PE, Brackett WW, et al. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(7):1729-35.

Brzovic V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, et al. In vitro genotoxicity of root canal sealers. *Int Endod J*. 2009;42(3):253-63.

Camargo CH, Camargo SE, Valera MC, Hiller KA, Schmalz G, Schweild H. The induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root canal sealers in mammalian cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(6):952-60.

Camargo CHR, Oliveira TR, Silva GO, Rabelo SB, Valera MC, Cavalcanti BN. Setting time affects in vitro biological properties of root canal sealers. *J Endod*. 2014;40(4):530-3.

Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod*. 2003;29(9):583-6.

Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod*. 1998;24(9):604-6.

Carrard VC, Costa CH, Ferreira LA, Lauxen IS, Rados PV. Micronucleus assay - A biomarker of genotoxic damage in exfoliated oral mucosa cells. *R Fac Odontol Porto Alegre*. 2007;48(1/3):77-81.

Costa JA, Rached-Junior FA, Souza-Gabriel AE, Silva-Sousa YT, Sousa-Neto MD. Push-out strength of methacrylate resin-based sealers to root

canal walls. *Int Endod J.* 2010;43(8):698-706.

Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin calcium hydroxide and silicone based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007;40(5):329-37.

El-Ma'aita AM, Qualtrough AJ, Watts DC. The effect of smear layer on the push-out bond strength of root canal calcium silicate cements. *Dent Mater.* 2013;29(7):797-803.

Ersahan S, Aydin C. Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-, methacrylate resin- and epoxy resin-based sealers. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4): 857-62.

Ersahan S, Aydin C. Dislocation resistance of iRoot SP, a calcium silicate based sealer, from radicular dentine. *J Endod.* 2010;36(12):2000-2.

Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, Schweikl H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. *J Endod.* 1999;25(5):359-63.

Galler KM, Schweikl H, Thonemann B, D'Souza RN, Schmalz G. Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(2):138-46.

Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Investig.* 1997;1(1):5-11.

Ghoneim AG, Lutfy RA, Sabet NE, Fayyad DM. Resistance to fracture of roots obturated with novel canal filling systems. *J Endod.* 2011;37(11):1590-2.

Grossman LI. Physical properties of root canal cements. *J. Endod.*, v. 2, n. 6, p. 166-75, 1976.

Guiotti FA, Kuga MC, Duarte MA, Sant'Anna Júnior AJ, Faria G. Effect of calcium hydroxide dressing on push-out bond strength of endodontic sealers to root canal dentin. *Braz Oral Res.* 2014;28(1).

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* 1996;12(3):186-93.

Haragushiku GA, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT, Alfredo E, Silva SC,

Silva RG. Adhesion of endodontic sealers to human root dentine submitted to different surface treatments. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(3):405-10.

Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin, zinc oxide eugenol, and calcium hydroxide based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002;35(2):153-8.

Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin based root canal sealers in vitro. *Biomaterials.* 2002;23(1):77-83.

Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15(7):767-71.

Internacional Standard Organization. ISO 7405 (2008) Dentistry: Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. 2 ed. Geneva: ISO copyright office; 2008. 34p.

International Standard Organization. ISO 9004:2009(E) Managing for the sustained success of na organization: A quality management approach. 3ed. Geneva: ISO copyright office; 2009. 54p.

Karapınar-Kazandag M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2011;44(7):626-34.

Kaufman AY, Rosenberg L. Paresthesia caused by Endomethasone. *J Endod.* 1980;6(4):529-31.

Kim YK, Grandini S, Ames JM, Gu LS, Kim SK, Pashley DH, et al. Critical review on methacrylate resin based root canal sealers. *J Endod.* 2010;36(3):383-99.

Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Silva RS. Realease of formaldeyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 1999;88(2):221-5.

Leonardo MR, Guillén-Carías MG, Pécora JD, Ito IY, Silva LA. Er: YAG laser: antimicrobial effects in the root canals of dogs' teeth with pulp necrosis and chronic periapical lesions. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(3):295-9.

Lertchirakarn V, Poonkaew A, Messer H. Fracture resistance of roots filled

- with gutta-percha or RealSeal. *Int Endod J.* 2011;44(11):1005-10.
- Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers *in vitro*. *Int Endod J.* 2008;41(1):72-7.
- Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod.* 2011;37(5):673-7.
- Marín-Bauza GA, Silva-Sousa YT, da Cunha SA, Rached-Junior FJ, Bonetti-Filho I, Sousa-Neto MD, et al. Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(4):455-61.
- Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *J Endod.* 2007;33(1):24-7.
- Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod.* 2005;31(4):307-9.
- Miletic I, Jukic S, Anic I, Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Osmak M. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *Int Endod J.* 2003;36(5):330-5.
- Moqeem-Saleh A, Hammad M, Silikas N, Qualtrough A, Watts DC. A laboratory evaluation of the physical and mechanical properties of selected root canal sealers. *Int Endod J.* 2010;43(10):882-8.
- Mukhtar-Fayyad D. Cytocompatibility of new bioceramic based materials on human fibroblast cells (MRC-5). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(6):137-42.
- Murphy WM. The testing of endodontic materials *in vitro*. *Int Endod J.* 1998;21(2):170-7.
- Mutoh N, Satoh T, Watabe H, Tani-Ishii N. Evaluation of the biocompatibility of resin based root canal sealers in rat periapical tissue. *Dent Mater J.* 2013;32(3): 413-9.
- Orstavik D; Eriksen HM; Beyer-Olsen EM. Adhesive properties and leakage of root canal sealer *in vitro*. *Int Endod J.*, v.16, p.59-63, 1983.
- Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Colombo M, Bianchi S, Visai I. Solubility of root canal sealers: a comparative study. *Int J Artif Organs.* 2010;33(9):676-

81.

Pumarola J, Berastegui E, Brau E, Canalda C, Jiménez de Anta MT. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;74(2):216-20.

Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res.* 2002;1(3):246-60.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of glass ionomer cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2006a;17(6):495-500.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006b;101(2):258-61.

Ribeiro DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(2):251-6.

Ribeiro DA, Alves de Lima PL, Marques ME, Salvadori DM. Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J.* 2006c;17(2):91-4.

Ribeiro DA, Marques ME, Salvadori DM. Lack of genotoxicity of formocresol, paramonochlorophenol, and calcium hydroxide on mammalian cells by comet assay. *J Endod.* 2004;30(8):593-6.

Ribeiro DA, Scolastici C, De Lima PL, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(5):637-40.

Rieger RMA, Green MMA Glossary of genetics and cytogenetics. London: Allen and Unwin; 1968.

Sagsen B, Üstun Y, Pala K, Demirbuga S. Resistance to fracture of roots filled with different sealers. *Dent Mater J.* 2012;31(4):528-32.

Salz U, Poppe D, Sbicego S, Roulet JF. Sealing properties of a new root canal sealer. *Int Endod J.* 2009;42(12):1084-9.

Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A

multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012;45(1):12-8.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975;31(1):9-15.

Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C. Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod.* 2001;27(4):259-65.

Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod.* 2002a;28(11):784-6.

Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod.* 2002b;28(11):749-53.

Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH plus. *Biomaterials.* 2000;21(9):939-44.

Schweikl H, Hiller K-A, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomat.* 2005;26(14):1713-9.

Silva GO. Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos em fibroblastos V79 [dissertação] São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Silva EJNL, Santos CC, Zaia AA. Long term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(1):43-7.

Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J.* 2006;39(1):40-7.

Sousa-Neto MD, Silva Coelho FI, Marchesan MA, Alfredo E, Silva-Sousa YT. Ex vivo study of the adhesion of an epoxy based sealer to human dentine submitted to irradiation with Er: YAG and Nd: YAG lasers. *Int Endod J.* 2005;38(12):866-70.

Sousa-Neto MD, Marchesan MA, Pécora JD, Junior AB, Silva-Sousa YT, Saquy PC. Effect of Er: YAG laser on adhesion of root canal sealers. *J Endod.* 2002;28(3):185-7.

Stiegemeier D, Baumgartner JC, Ferracane J. Comparison of push-out bond strengths of resilon with three different sealers. *J Endod.* 2010;36(2):318-21.

Suzuki P, Souza Vd, Holland R, Gomes-Filho JE, Murata SS, Dezan Junior E, et al. Tissue reaction to Endométhasone sealer in root canal fillings short of or beyond the apical foramen. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(5):511-6.

Tai KW, Huang FM, Huang MS, Chang YC. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(1):73-7.

Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Kuttler S, García-Godoy F, King NM, et al. Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. Evidence of biodegradation from a simulated field test. *Am J Dent.* 2007;20(6):365-9.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992;271(1):69-77.

Torabinejad M, Walton RE. *Endodontics: principles and practice.* St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2009.

Van Landuyt KL, Geebelen B, Shehata M, Furche SL, Durner J, Van Meerbeek B, et al. No evidence for DNA double strand breaks caused by endodontic sealers. *J Endod.* 2012;38(5):636-41.

Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J.* 2006;39(6):464-71.

Waltimo TM, Boiesen J, Eriksen HM, Ørstavik D. Clinical performance of 3 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(1):89-92.

Willershausen B, Marroquín BB, Schäfer D, Schulze R. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod.* 2000;26(12):703-7.

Wu MK, van der Sluis LW, Wesselink PR. A 1-year follow-up study on leakage of single-cone fillings with RoekoRSA sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(5):662-7.

Yilmaz Z, Dogan AL, Ozdemir O, Serper A. Evaluation of the cytotoxicity of different root canal sealers on L929 cell line by MTT assay. *Dent Mater J.*

2012;31(6):1028-32.

Zhang W, Li Z, Peng B. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. *J Endod.* 2010;36(12):1978-82.

Zhang W, Li Z, Peng B. Assessment of a new root canal sealers apical sealing ability. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(6):79-82.

Zmener O, Pameijer CH, Macchi RL. Coronal curing depth of two dual-cure, methacrylate-based endodontic sealers. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2008;20(7):suppl 2-5;quiz 5-6.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Citotoxicidade, Genotoxicidade, Resistência Adesiva e Microdureza de sete cimentos endodônticos, um ano de avaliação **Pesquisador:** Monique França **Área**

Temática:

Versão: 2

CAAE: 34241014.4.0000.0077

Instituição Proponente:Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 831.145

Data da Relatoria: 14/10/2014

Apresentação do Projeto:

Título Público da Pesquisa: Citotoxicidade, Genotoxicidade, Resistência Adesiva e Microdureza de sete cimentos endodônticos, um ano de avaliação: Na tentativa de avaliar alguns materiais disponíveis no mercado quanto a propriedades biológicas e físico-químicas, este estudo determinará in vitro a citotoxicidade e a genotoxicidade através do ensaio de XTT e da formação de micronúcleos, respectivamente, dos cimentos endodônticos Apexit Plus, Real Seal, Endo Rez, Roeko Seal, AH Plus, Endomethasone, e do cimento biocerâmico iRoot SP. Os cimentos serão avaliados após 24 horas de espatulação e também depois de longos períodos de endurecimento dos mesmos (72 h, 1 semana, 1, 3, 6 meses e após um ano) sobre cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano (hPDLF). A resistência adesiva dos cimentos às paredes do canal radicular será avaliada por meio do ensaio de push-out, além disso, a microdureza dos materiais será determinada através de microdurômetro (ambos em 2 períodos de avaliação:15 dias e 1 ano após a manipulação).

Objetivo da Pesquisa:

Devido à procura por um material com características adequadas tanto físicas quanto biológicas, este estudo tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade por meio de ensaios de citotoxicidade (teste de XTT) e de genotoxicidade (ensaio de micronúcleos) dos sete cimentos citados, além de avaliá-los quanto às propriedades físicas e mecânicas através do teste de microdureza e de “push-out”, respectivamente. A hipótese deste estudo é de que os cimentos endodônticos à base de resina e de óxido de zinco e eugenol possuem maior potencial cito e genotóxico, sobre as células do ligamento periodontal do que os cimentos à base de silicone. Contudo é complicado saber qual o comportamento biológico e físico-químico dos cimentos por longos períodos após a manipulação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

FOI REELABORADO

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

1-Deve ser reformulado o texto Riscos e Benefícios.

2-Como será trabalhado com o paciente?

3-Que outro material humano será utilizado?

4-Qual a procedência das células (Fibroblastos do ligamento periodontal humano), foi coletada em cirurgia (se sim, qual o número do processo de aprovação do CEP?) ou adquirida em banco de célula

5-Descrever detalhadamente a necessidade de um número tão expressivo de dentes (no protocolo e doação constam 140 dentes)

Recomendações:

Deve ficar pendente, pois em uma pesquisa que utiliza material humano, o pesquisador deve saber diferenciar riscos e benefícios

Venho através desta carta responder as perguntas referente ao parecer do comitê de ética de número 34241014.4.0000.0077

Primeiramente, respondendo ao item riscos e benefícios o presente estudo não oferece riscos por se tratarem de dentes extraídos por indicações diversas, como a doença periodontal. Não operaremos com seres humanos. Os benefícios são estudar melhor as variáveis propostas trazendo importantes observações do ponto de vista científico e/ou clínico. Busca-se saber qual o comportamento biológico e físico-químico dos cimentos por longos períodos após a manipulação auxiliando aos clínicos quanto o melhor material a ser utilizado quanto a longevidade das propriedades físicas e biológicas. Não

serão utilizados pacientes no estudo proposto e nenhum outro material humano além das células e dos dentes extraídos serão utilizados. As células PDLF (Fibroblastos do ligamento periodontal humano) foram compradas da empresa LONZA Clonetics™ Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Systems HPdLF, Lonza Walkersville, Inc., www.lonza.com scientific.support@lonza.com Scientific Support: 800-521-0390 Document # TS CC-7049-3 11/10 Walkersville, MD 21793-0127 USA © 2010 Lonza Walkersville, Inc.

O número de dentes se faz necessário visto que estamos estudando 7 cimentos endodônticos de uso clínico, recém espatulados e 1 ano após o endurecimento, com um n de 10 espécimes temos $10 \times 7 = 70 \times 2 = 140$ dentes, pois serão avaliados dois períodos. Segundo a literatura o número de amostras utilizados neste tipo de estudo é de um $n=10$, mas alguns estudos utilizam um n superior a 10 amostras. Costa et al., em 2010, para avaliar a resistência adesiva através do teste de push-out utilizou sessenta raízes de caninos distribuídos em seis grupos ($n = 10$). Já Ersahan e Aydin, 2010, utilizaram sessenta caninos superiores humanos para obter 120 discos de 4 mm de espessura de dentina que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n = 30$) para o tratamento com um dos quatro cimentos diferentes (iRoot SP, AH Plus, Sealapex, EndoREZ). (Ersahan S & Aydin C. Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-, methacrylate resin- and epoxy resin-based sealers. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013; 71: 857–862) Ghoneim et al., 2011, utilizaram cinquenta pré-molares inferiores unirradiculares. As raízes foram divididas de acordo com o sistema de obturação em 4 grupos ($n= 10$). (Ghoneim GA, Reem A. Lutfy, Nihal E. Sabet e Dalia M. Fayyad. Resistance to fracture of roots obturated with novel canal-filling systems. *J Endod* 2011;37(11):1590-1592). SASEN et al., em 2012, Cinquenta e cinco incisivos centrais superiores humanos foram selecionados e divididos aleatoriamente em cinco grupos $n=15$. (SASEN , Yakup ÜSTÜN, Kanad PALA, e Sezer DEMRBUA Resistance to fracture of roots filled with different sealers. *Dent Mater J*. 2012; 1(4): 528-32). Guiotti et al, 2014, utilizaram sessenta caninos humanos divididos em seis grupos ($n = 10$). (Guiotti FA, Kuga MC, Duarte MAH, Sant’Anna Júnior A, Faria G. Effect of calcium hydroxide dressing on push-out bond strength of endodontic sealers to root canal dentin. *Braz Oral Res*. 2014;28(1):1-6).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TERMO DE DOAÇÃO DOS 140 DENTES ESTA OK

Recomendações:

- 1-Deve ser reformulado o texto Riscos e Benefícios: ÍTEM CONTEMPLADO
- 2-Como será trabalhado com o paciente? NÃO SERÁ TRABALHADO COM PACIENTES AS CÉLULAS SERÃO COMPRADAS
- 3-Que outro material humano será utilizado? SÓ OS DENTES
- 4-Qual a procedência das células (Fibroblastos do ligamento periodontal humano), foi coletada em cirurgia (se sim, qual o numero do processo de aprovação do CEP?) ou adquirida em banco de célula (CÉLULAS SERÃO COMPRADAS)
- 5- Descrever detalhadamente a necessidade de um número tão expressivo de dentes (no protocolo de doação constam 140 dentes): FOI EXPLICADO E REGISTRADO COM ARTIGOS CIENTIFICOS

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Nd

Situação do Parecer:Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:Não **Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado concorda com o parecer da relatora.SAO JOSE DOS CAMPOS, 14 de Outubro de 2014

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)

ANEXO B – Declaração de doação de dentes humanos

unesp

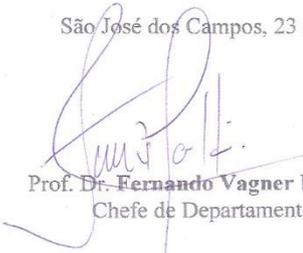
UNIVERSIDADE ESTADUAL "PAULISTA"
SÉRGIO DE MESQUITA FILHO
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que os 140 dentes unirradiculados humanos recolhidos com a finalidade de pesquisa, para trabalho de Dissertação de Mestrado da aluna **Monique Costa Moreira França**, orientanda do Professor Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo, foram extraídos de pacientes atendidos no ambulatório da Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos – UNESP, por motivos periodontais e que seriam descartados após a extração, caso não fossem de utilidade para a referida aluna.

Declaro, ainda, ter sido solicitado e obtido o consentimento esclarecido do paciente quanto à doação do material para pesquisa científica.

São José dos Campos, 23 de julho de 2014.


Prof. Dr. **Fernando Vagner Raldi**
Chefe de Departamento