

JOSÉ CARLOS RIVAS GUTIÉRREZ

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS
OBTURADORES DE CANAIS RADICULARES: INFLUÊNCIA NA
LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α ,
INTERFERON- γ E ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA DE
CÉLULAS MURINAS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", para
obtenção do Título de Doutor em
Odontologia, Área de
Endodontia.

**ORIENTADOR:
PROF^a DR^a IRACILDA ZEPPONE CARLOS**

ARARAQUARA

2006

JOSÉ CARLOS RIVAS GUTIÉRREZ

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS
OBTURADORES DE CANAIS RADICULARES: INFLUÊNCIA NA
LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α ,
INTERFERON- γ E ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA DE
CÉLULAS MURINAS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
2° Examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho
3° Examinador: Prof. Dr. Fabio Luiz Camargo V Berbert
4° Examinador: Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes
5° Examinador: Prof. Dr. Abílio Albuquerque Maranhão de Moura

São Paulo, 19 de Dezembro de 2006

DADOS CURRICULARES

JOSÉ CARLOS RIVAS GUTIÉRREZ

NASCIMENTO 17.09.1973 – León, Guanajuato, México

FILIAÇÃO José Rivas Martínez

Ma. Elena Gutiérrez Jiménez

1992/1997 Curso de Graduação Faculdade de Odontologia da UQI (Universidad Quetzalcóatl de Irapuato)

1998/1999 Curso de Especialização em Cariologia Clínica do ILA (Instituto de Ciências y Humanidades)

2000/2001 Professor Titular na Disciplina de Traumatologia Dental do ILA

2000/2001 Professor Titular na Disciplina de Emergências Odontológicas do ILA

2000/2001 Professor Titular na Disciplina de Endodontia Clínica do ILA

2001/2003 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

2005/2006 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

DEDICATÓRIA

A *Deus*, pela oportunidade de existir,
viver, desafiar, conquistar e cumprir
minha missão... Por me guiar durante
minha trajetória e ter colocado no meu
caminho Grandes Pessoas

A meus pais, *José e Ma. Elena*, por tudo
o que sou e que tenho, pela filosofia da
vida, pela dedicação, por tanto amor e
apoio incondicional, vocês de alguma
forma conquistaram junto comigo este
trabalho que por maior que fosse a
distância, estiveram sempre ao meu lado

A meu irmão *Luis*, por estar sempre
presente, pelo amor e pela alegria de
compartilhar grandes momentos

À *Alejandra* pelo amor, paciência,
compreensão e incentivo para seguir
sempre adiante... Mas principalmente
agradeço por existir na minha vida!!!
Quero que saiba que vivo por você!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora *Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos*, que através de seus gestos, amizade, sabedoria e dedicação, formou um discípulo e admirador... Por ter me ajudado a crescer

Ao *Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo*, por ser um exemplo de superação constante, pela sabedoria de vida, pela amizade e por acreditar em mim... Por ser para mim um verdadeiro irmão

A meu amigo *Henrique*, por ser um exemplo de fortaleza e superação, pelo grande AMOR à vida que demonstra ter

AGRADECIMENTOS

Aos *Profs. Drs. Roberto Miranda Esberard, Mário Tanomaru Filho, Juliane Tanomaru, Idomeo Bonetti Filho e Fábio Luis Camargo Villela Berbert*, meu respeito e agradecimentos pelos ensinamentos, sem eles, com certeza minhas dificuldades seriam maiores... pela amizade, companheirismo e atenção que outorgaram a minha vida, nesta maravilhosa cidade

A meu amigo *Ronaldo Sousa Ferreira* pela irmandade que a gente conseguiu formar, você é uma pessoa muito especial na minha vida, levo lembranças de você por sempre

A meus colegas do Curso de Doutorado da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: *Denise, Cristiane, Erick, Fernandinho, Fernanda, Renata, Henrique, Gustavo, Eduardo, Bier, Alexandre, Mauricio, Marco Aurélio, Renato e Anderson*, que mais que ser simples companheiros tornaram-se meus irmãos

A meus colegas do Curso de Mestrado da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: *Hugo, Norberto e Santiago*, os “Três Mosqueteiros”, obrigado por compartilhar gratos momentos, tanto dentro como fora da Faculdade

A meus colegas do Curso de Mestrado da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: *Frederico, Fernando, Guilherme, Melina, Claudia, Erica e Adriana* pela amizade

A minha irmãzinha *Paula Nakazone* pela convivência e amizade sincera

A todos os *Professores do Curso de Pós-Graduação*, pelos conhecimentos, apoio e amizade a mim dedicados

A *Marisa Campos Polesi Placeres*, pelos conhecimentos, apoio e amizade, sem sua ajuda este trabalho não houvesse se tornado possível... Mil Gracias!

Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, em especial à *Mara, Flávia e Rosângela*

À *Maria Helena Matsumoto Komasti Leves*, pela revisão bibliográfica

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia: *Dona Luiza, Dona Emilia, Sr. Mário, Sr. Edison e Sr. Pedro*

À *Micheli e Danielle*, alunas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela grande contribuição para a realização deste trabalho e planejamento estatístico

Aos meus grandes amigos que fiz na cidade de Araraquara: *Roberta, Monique e Fabio, Flamarion, Vítinho, Julio, Freddy, Julio César, Marcos, Fernandão, Victor Gustavo, Tobal, Geraldine, Gabi, Niely, Renato, Mauricio, Cristiano, Gaúcho, Amauri, Vagal, Pelos, Caniggia, Nilão, Eduardo, Rinaldo, Adriano, Murilo, Darlon, Frank, Pablo, Hermes e Matheus*, pela amizade sincera

Aos meus grandes amigos “estrangeiros” que hoje já são também “brasileiros” e vice-versa, *Maura e Martín, Iván e Cristina, Andrés e Denise, Mauricio e Vanessa*, pela irmandade que a gente formou e fortaleceu com o passar dos dias

Aos amigos mexicanos: *Luis Francisco e Claudia, Luis Gerardo e Vanessa, Arturo e Ana María, Miguel Angel e Marcela, Carlos e Débora, Armando e Miriam, Julio e Adilia, José Luis e Ariadna, David e Yolanda, Alberto e Maritere, Andrés, Sergio, Salvador, Mario, Lilia, María, Sofía e Nohemí* que sempre estiveram torcendo por mim

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DA LITERATURA	20
PROPOSIÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODO	81
ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
RESULTADO	97
DISCUSSÃO	120
CONCLUSÃO	144
REFERÊNCIAS	146
Anexos	163

Lista de Abreviaturas

ConA: Concanavalina.

CSF: Unidade formadora de Colônia.

EDRF: Fator de relaxamento derivado do Endotélio.

EGF: Fator de Crescimento Epitelial.

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio.

IFN: Interferon.

IL: Interleucina.

LPS: Lipopolissacarídeo.

MMP: Matriz Metalproteinase.

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio).

NO: Óxido Nítrico.

OAF: Fator Ativador de Osteoclasto.

PBS: Solução tamponada de fosfatos.

PEG: Polietilenoglicol.

PMN: Polimorfonucleares.

RNI: Reativos Intermediários do Nitrogênio.

ROI: Reativos Intermediários do Oxigênio.

TCA: Tirocalcitonina.

TNF: Fator de Necrose Tumoral.

Rivas Gutiérrez JC. Avaliação da citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares: influência na liberação de fator de necrose tumoral- α , Interferon- γ e óxido nítrico em cultura de células murinas [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2006.

RESUMO

Os macrófagos constituem uma população celular do sistema imune. Estas células podem ser ativadas por uma variedade de estímulos e suas principais funções incluem a fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos, produção de citocinas e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H_2O_2). Os cimentos endodônticos são capazes de promover uma estimulação do sistema imune. Neste estudo, foram analisados os níveis de quantificação das citocinas, além do mediador óxido nítrico, como uma medida de estimulação de macrófagos peritoneais de camundongos. Através de análise estatística dos dados, foram observados os níveis de citotoxicidade dos macrófagos de camundongos estimulados pelos diferentes cimentos endodônticos, meio RPMI-1640 (grupo controle -) e LPS (grupo controle +). Os diferentes cimentos testados apresentaram concentrações com diferentes citotoxicidades: Sealapex 35 $\mu\text{g/ml}$, Polímero de Mamona 8,75 $\mu\text{g/ml}$, do Epiphany 17,5 $\mu\text{g/ml}$, do Epiphany + Primer 17,5 $\mu\text{g/ml}$, do Primer 35 $\mu\text{g/ml}$, do EndoRez 17,5 $\mu\text{g/ml}$ e do AH Plus 70 $\mu\text{g/ml}$. Após a adequação das concentrações viáveis dos cimentos testados conclui-se que o material que mais estimulou a liberação de NO foi Primer, seguido do Endorez, AH Plus, Epiphany, Sealapex, Epiphany + Primer. O Polímero de Mamona foi o que estimulou a uma menor produção de NO. Em relação à produção de TNF- α o material que estimulou maior produção foi o Primer, seguido de Epiphany, AH Plus, Epiphany + Primer, Sealapex e Polímero de Mamona. O EndoRez não foi capaz de estimular a produção de TNF- α . Nenhum dos cimentos testados induziu à liberação de IFN- γ , sugerindo que outros mediadores tais como IL-1 e IL-12 possam estar envolvidos na liberação de NO observada no presente estudo.

Palavras-chave: Citotoxicidade imunológica; óxido nítrico; fator de necrose tumoral alfa; interferon tipo II; técnicas de cultura de células.

Rivas Gutiérrez JC. Evaluation of the cytotoxicity of endodontic sealers: influence on liberation of tumor necrotic factor-alpha, interferon gamma and nitric oxide in murine cells culture [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2006.

ABSTRACT

It was evaluated the cytotoxicity of the sealers, Sealapex, Polímero de Mamona, Epiphany, EndoRez and AH Plus in relation to the release of Nitric Oxide, Tumor Necrotic Factor-Alpha and Interferon Gamma in murine cells culture. After the ideal concentration was found, according to MTT test, it was concluded that the sealers with higher release were Polímero de Mamona, EndoRez, Epiphany + Primer, Epiphany, Primer do Epiphany = Sealapex and AH Plus. All sealers reached lower levels of cytotoxicity than control.

Keywords: Cytotoxicity immunologic; nitric oxide; tumor necrosis factor-alpha; interferon type II; cell culture techniques.

Introdução

O tratamento do sistema de canais radiculares, desde o estabelecimento do correto diagnóstico até a preservação do caso, constitui-se de atos operatórios interligados entre si, não podendo negligenciar-se qualquer etapa, sendo a etapa operatória da obturação a que representa um reflexo dos predicados técnicos do profissional e, conseqüentemente, a comprovação do sucesso obtido em todas as etapas anteriores (Leonardo, Leal⁸⁹, 1998).

De acordo com Bonetti Filho²², em 1986, a obturação e o material obturador recebem uma ênfase especial porque substituirão a polpa radicular e refletirão a postura do profissional em relação ao tratamento de canais radiculares.

O material obturador utilizado deve preencher requisitos adequados de propriedades biológicas e físico-químicas, pois, ficará em contato permanente com os tecidos apicais, periapicais e com tecidos subjacentes, de forma que possa oferecer tolerância tecidual e selamento o mais perfeito dos canais radiculares. Dessa forma, visando à obtenção de uma obturação impermeável, o mais possível, e auxiliado por técnicas aprimoradas de obturação de canais radiculares, é necessário que materiais obturadores inseridos dentro do canal radicular no momento da obturação, cumpram suas reais finalidades de selamento em respeito aos tecidos do ápice e periápice.

Os cones, representativos da parte sólida e os cimentos obturadores (parte plástica), têm como função, preencher todos os espaços vazios modelados anteriormente pela instrumentação, promovendo uma obturação tridimensional a mais completa possível e combatendo os microrganismos que escaparam da ação do preparo biomecânico e do curativo de demora (Beltes et al.¹³, 1995; Leonardo⁹¹, 1997).

Levando-se em consideração os mais variados aspectos de anatomia morfológica encontrada no terço apical dos dentes, esses materiais entram em contato direto com tecidos apicais e periapicais por um longo período, sendo que nesse momento, é de forma imperiosa a biocompatibilidade dos materiais obturadores (Bilginer et al.¹⁹, 1997; Leonardo⁹¹, 1997; Kolokouris et al.⁷⁹, 1998). Assim, o selamento do forame apical pela

deposição de tecido mineralizado ou fibroso no ápice, representa o isolamento desse material obturador (corpo estranho), do restante do organismo.

A partir dos cimentos obturadores à base de óxido de zinco e eugenol surgiram os cimentos à base de resina epóxica, com hidróxido de cálcio, tendo como exemplo de marcas comerciais, Keer Pulp Canal Sealer, Topseal, Sealapex, AH Plus, Endomethasone, Endo-Rez Dual, Epiphany e Endofill^{2,30,44,51,90,108,118,187}.

O conceito de biocompatibilidade está mudando. Durante muito tempo considerou-se, tradicionalmente, a biocompatibilidade como sendo a falta de interação significativa entre o contato material/tecidos. Hoje, sabe-se que muitos materiais são compatíveis quando introduzidos em um determinado local do organismo, mas respondem de uma maneira diferente em outros locais. Os materiais restauradores dentários constituem um bom exemplo desta dependência de local. Uma definição mais apropriada de biocompatibilidade seria a capacidade de um material interagir apropriadamente com a resposta do hospedeiro numa aplicação específica (Williams¹⁸², 1990).

A citotoxicidade dos cimentos obturadores, juntamente ou isoladamente de seus componentes, tem sido estudada *in vitro* (Gerosa et al.⁵¹, 1995; Vajrabhaya et al.¹⁷⁵, 1997) e *in vivo* (Pertot et al.¹²⁷, 1992; Torabinejad et al.^{169,170} 1995, Pertot et al.¹²⁸, 1997; Rasquín¹³⁶, 1997). Levando-se em consideração que a legislação atual dificulta através das normas da Ética, o emprego de pesquisas *in vivo* (Garcés-Ortíz, Ledesma Montes⁴⁹, 1997) e também as dificuldades inerentes à mesma, com grande número de variáveis, temos como opção a realização das pesquisas *in vitro*.^{3,7,38,43,80,99,131,152,159,180}

No estudo de células em meio de cultura ocorrem as condições necessárias para avaliar o metabolismo e comportamento celular, em contato com diferentes materiais. (Junqueira, Carneiro⁷⁰, 1997). A análise de células é opção para reprodução das reações celulares ocorridas sobre os fatores experimentais e número de variáveis, sendo sugerido que se deva conhecer o comportamento de um grupo de células, antes de utilizá-lo como modelo de estudo (Arenholt-Bindslev, Bleeg⁶, 1990; Egea, Rubio Manzanares⁴², 1998).

Nas culturas de células, os cimentos obturadores ou os seus componentes que provocam alterações morfofuncionais possíveis de serem observadas e analisadas sob microscopia eletrônica ou óptica, com ou sem marcação celular com radioisótopos. As alterações da morfologia celular evidenciam fenômenos intra e extracelulares de citotoxicidade partindo da instalação de processos degenerativos frente à exposição celular com material presente nos meios de cultura. As alterações morfofuncionais são indicativas de estimulação da capacidade funcional de síntese protéica, enzimática, presença de mediadores químicos de vital importância no processo reparatório reacional, fatores de crescimento celular, produtos de ácido araquidônico, citocinas e outras substâncias que desencadeiam situações ou alterações degenerativas como o peróxido de hidrogênio (Pick, Mizel¹³⁰, 1981; Leonardo⁹¹, 1997) e o óxido nítrico (Palmer et al.¹²¹, 1987; Moncada et al.¹¹⁰, 1991, Ialenti et al.⁶⁶, 1992; Teixeira et al.¹⁶⁸, 1993; Vespa et al.¹⁷⁷, 1994; Norris et al.¹¹⁴, 1995).

No processo inflamatório, o tamanho da lesão, tipo, capacidade dos cimentos de estimular a ação dos macrófagos e a liberação de mediadores químicos responsáveis nessas respostas, são alguns dos fatores a serem levados em consideração (Leonardo⁹¹, 1997).

A agressão, oriunda do contato com os materiais obturadores ocasiona, nas células, alterações morfofuncionais e até sua morte, sendo que a liberação de mediadores químicos nos ajuda a avaliar a citotoxicidade desses materiais (Leonardo⁹¹, 1997), uma vez que, quanto maior a liberação desses mediadores, maior é a agressão.

Revisão da literatura

Este capítulo é uma revisão da literatura concernente aos macrófagos, óxido nítrico, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e os cimentos obturadores de canal radicular: Sealapex, AH Plus, Polímero de Mamona, Endo-Rez e Epiphany.

Macrófagos

O macrófago ativado sofre uma série de alterações morfo-funcionais, como capacidade fagocítica, bactericida e citotóxicas aumentadas, aumento de conteúdo enzimático e secreção de produtos biologicamente ativos. (Unanue et al.¹⁷⁴, 1976)

O termo “macrófagos ativados” foi originalmente introduzido para descrever o estado no qual os macrófagos têm maior capacidade de fagocitar microrganismos e exercer atividades antimicrobianas (Karnovsky, Lazdins⁷², 1978).

Atualmente, se aceita que macrófagos ativados sejam os responsáveis pela resistência a diversos parasitas intracelulares ou facultativamente intracelulares. Embora o conceito de macrófagos ativados seja impreciso, incluindo uma série de complexos eventos, o termo tem sido utilizado, designando-se a maneira pela qual a ativação foi induzida, ou seja, bactericidamente, tumoricidamente, fagociticamente, metabolicamente e assim por diante, (North¹¹⁵, 1978), ou especificando o propósito pelo qual o macrófago foi ativado, por exemplo, para destruir determinado microorganismo, células tumorais, corpos estranhos.

Perdigon et al.¹²⁶, em 1986, estudaram os efeitos da administração oral e intraperitoneal de *L. casei* e *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, na ativação de macrófagos. Eles utilizaram camundongos Swiss que receberam as bactérias por via oral por oito dias. Após esse período os macrófagos foram obtidos e avaliados quanto à sua atividade enzimática e capacidade de fagocitose de carbono coloidal. Os resultados mostraram que a atividade enzimática dos macrófagos nos animais que receberam *L. delbrueckii* spp.

bulgaricus por via intraperitoneal era dez vezes maior nos animais que receberam via intraperitoneal e seis vezes maior por via oral. Nos testes da fagocitose, houve aumento em todos os animais tratados, porém os animais tratados com *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* mostraram os melhores resultados. Portanto, os autores sugeriram que a ingestão de lactobacilos pode representar uma via de estimulação não específica, podendo ser capaz de aumentar a resposta imune sistêmica ou modular as funções de células imunocompetentes.

Em um processo inflamatório, a fagocitose é uma das atividades importantes dos macrófagos. Estas células têm uma grande capacidade de sintetizar e secretar substâncias intra e extracelulares, como enzimas que afetam as proteínas extracelulares, substâncias envolvidas no processo de defesa e fatores reguladores da atividade de outras células, especialmente as citocinas e fatores de crescimento. (Nathan¹¹³, 1987).

Os macrófagos representam a primeira linha de defesa do organismo, promovendo a eliminação dos microrganismos, tanto pela fagocitose quanto pela liberação de agentes tóxicos, como os intermediários reativos do nitrogênio (RNI) e do oxigênio (ROI) (Ding et al.³⁹, 1988).

Sabe-se que a inflamação é, fundamentalmente, uma resposta de defesa do organismo, visando destruir, diluir ou circunscrever o agente agressor, conduzindo ao processo de reparo tecidual (Baumman, Gauldie¹², 1994).

Os macrófagos fazem parte, juntamente com mastócitos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos, da resposta inflamatória, resposta essa de defesa do organismo que ocorre no tecido conjuntivo visando destruir, diluir e isolar o agente agressor por meio da fagocitose. A fagocitose é uma das importantes atividades dos macrófagos, os quais têm a capacidade de sintetizar e secretar enzimas e fatores reguladores da atividade de outras células como as citocinas e fatores de crescimento. A liberação de linfocinas pelos

linfócitos T promove a ativação de macrófagos para sensibilizá-los contra antígenos presentes em microrganismos e/ou células indesejáveis (Cotran et al.³⁷, 1996).

Também, macrófagos e linfócitos desempenham papel essencial no mecanismo mediado por células envolvidas na inflamação crônica (Trowbridge, Emiling¹⁷³, 1996). Durante o desenvolvimento da imunidade específica, os macrófagos são requisitados para processar e apresentar o antígeno para os linfócitos T. Eles também servem como células “acessórias” aos linfócitos, liberando fatores solúveis envolvidos na defesa do hospedeiro. Ainda, macrófagos possuem a prioridade de quando ativados, possuem intensa capacidade de fagocitose, eliminando, assim, os microorganismos e corpos estranhos. Linfócitos T ativados são considerados como efetores chave, capazes de produzir linfocinas e de modificar o comportamento de outras células. Desta maneira, são capazes de facilitar ou suprimir uma resposta imune. A inflamação crônica é frequentemente associada à destruição irreversível do parênquima, sendo esta lesão preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Finalmente, afirma que a proliferação fibroblástica, a produção de colágeno e a neovascularização são aumentadas pela secreção de citocinas dos linfócitos T e de macrófagos.

Os macrófagos constituem a segunda maior população celular do sistema imune. Eles se originam na medula óssea como monócitos sangüíneos e, após migração e maturação, vão para os tecidos como macrófagos maduros. Os macrófagos podem ser ativados por uma variedade de estímulos e suas principais funções incluem a fagocitose de partículas estranhas, apresentação de antígenos e produção de citocinas (IL-6, TNF- α , IL-1, IL-12) e compostos intermediários do nitrogênio (NO) e do oxigênio (H₂O₂). Deste modo, os macrófagos podem participar de ambas as respostas imunes, inata e adaptativa. Os macrófagos exercem a maior função na defesa do hospedeiro contra infecções e formação de tumores. De particular interesse, o NO e H₂O₂ produzidos pelos macrófagos atuam destruindo ou inibindo o crescimento de bactérias, fungos, parasitas e células tumorais. O termo macrófago ativado é amplamente utilizado para designar o aumento de suas atividades biológicas. Muitos parâmetros, tais como aderência, fagocitose, atividade bactericida e características bioquímicas podem ser tomados como indicativos do grau de

ativação dessas células. O óxido nítrico é produzido pela indução da enzima óxido nítrico síntase nas células imunes em resposta a citocinas tais como TNF- α , IFN- γ e IL-2 (Janeway, Traves⁶⁸, 1997).

Quando um cimento obturador de canais radiculares, entra em contato com o tecido conjuntivo periapical, promove a estimulação e ativação dos macrófagos, para a realização da fagocitose (Leonardo⁹¹, 1997).

Takahashi¹⁶⁰ em 1998, manifestou que a infecção multimicrobiana da polpa dental provoca respostas inflamatórias e causa, finalmente, a destruição do osso nos tecidos periradiculares. Além das bactérias, as substâncias nocivas, tais como, componentes de proteína degradada e o colesterol poderiam, também, agir como antígenos e estimular uma resposta de infiltração, que pudesse ser prejudicial aos tecidos periradiculares. Histologicamente, a densidade de infiltração das células imunocompetentes é vista em lesões periradiculares e suas reações de infiltração podem induzir a reabsorção do osso. Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos migram às lesões periapicais. Os papéis patológicos das células periradiculares foram avaliados por meio dos marcadores fenotípicos por citometria de fluxo, mas os resultados são ainda controversos. Recentemente, o desenvolvimento técnico na imunologia e na biologia molecular tornaram possível investigar a patogênese de muitas doenças no nível molecular. A investigação da análise funcional das células imunes e de suas moléculas reguladoras tais como moléculas de adesão conduzirão a uma compreensão melhor da patogênese de lesões periradiculares. Na indução da inflamação temos a participação de anticorpos, citocinas, matriz extracelular, metalloproteinases, fatores do crescimento e derivados do metabolismo do ácido araquidônico. Pesquisas que visem investigações desses parâmetros induzirão à melhor compreensão dos mecanismos patológicos das infecções periradiculares.

O sistema fagocítico mononuclear possui duas funções principais: remover antígenos particulados (fagócitos profissionais) e apresentar antígenos às células T (linfócitos T), desencadeando a resposta imune. Sendo que as várias funções dos

macrófagos podem ser resumidas na liberação de inúmeros mediadores no meio externo (Roitt et al.¹³⁹, 1999).

Os macrófagos têm um período de vida longo e não são células terminais, ao contrário dos leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos). A sua sobrevivência no local da infecção pode-se caracterizar, além de outros fatores, pela sua agregação e fusão às células recém-chegadas ocorrendo, assim, a formação das células gigantes multinucleadas inflamatórias^{20,37,57,82}.

A ativação dos macrófagos e linfócitos produz uma série de alterações morfofuncionais, como por exemplo, a capacidade fagocítica, bactericida e citotóxica. Macrófagos peritoneais de camundongos, como modelo celular *in vitro*, são de fácil obtenção para se avaliar respostas celulares frente a pastas e cimentos endodônticos auxiliando a investigação da biocompatibilidade destes materiais especialmente sobre seus efeitos na resposta inflamatória imune (Egea, Rubio-Manzanares⁴², 1998).

Metzger¹⁰¹, em 2000, numa revisão sobre a presença dos macrófagos nas lesões periapicais, considerou-os como a principal fonte das citocinas interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-1alfa (IL-1 α) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Nesse trabalho de revisão, as citocinas foram consideradas mediadores que podem contribuir para a iniciação e regulação do processo inflamatório, participando no processo de reparo através da ativação dos fibroblastos, elevando a síntese de colágeno produzido por essas células ou, também, por outro lado, apresentarem ação destrutiva, como no caso da reabsorção óssea, observada pelos osteoclastos influenciados por elas.

Óxido Nítrico

Inicialmente, a liberação de óxido nítrico (NO) ocorrida pela atividade biológica e a ação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) foram estudadas por Palmer et al.¹²¹, em 1987. Este estudo foi realizado em culturas de células constituídas da porção endotelial de células aórticas de coelhos ou células 3T3, sendo o NO determinado por meio do método de quimioluminescência proveniente de sua reação com o ozônio. O relaxamento produzido pelo EDRF foi indistinguível daquele produzido pelo NO e os resultados sugeriram que tanto o EDRF como o NO são idênticos constituindo-se em uma única molécula.

Uma revisão sobre o óxido nítrico (NO) abordando seus aspectos fisiológicos, patofisiológicos e farmacológicos foi realizada por Moncada et al.¹¹⁰, em 1991. O NO tem ações farmacológicas tais como: relaxante vascular, inibidor da agregação plaquetária e citoprotetor. Pode ser liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano. O LPS, assim como o IFN- γ é um ativador de macrófagos.

O NO é sintetizado por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintase ou sintetase (NOS), que converte a L-arginina em NO e L-citrulina. Três isoenzimas foram identificadas como responsáveis pela produção de NO e foram denominadas de neuronal (nNOS ou NOS 1), induzível (iNOS ou NOS 2) e endotelial (eNOS ou NOS 3). A iNOS foi originalmente purificada e clonada a partir de macrófagos ativados, embora células musculares cardíacas, células de músculo liso vascular e células de glia também produzam NO a partir da iNOS (Sarih et al.¹⁴², 1993; Lopes-Farré et al.⁹², 1998).

Dugas et al.⁴⁰, 1995, Moncada, Higgs¹⁰⁹, em 1995, constataram que o NO desempenha papel regulatório no início e desenvolvimento de várias respostas inflamatórias e imunes, em humanos.

Em 1993, Teixeira et al.¹⁶⁸, estudaram o papel das prostaglandinas e do óxido nítrico (NO) na reação inflamatória aguda em tecido intradérmico de porcos da Índia. A administração de um inibidor da síntese de NO, N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-

NAME), dependendo da dose, inibiu a formação de edema, que foi induzido em resposta à injeção intradérmica de bradicinina. A inibição através da L-NAME na indução de edema pela bradicinina, é o efeito oposto à injeção de nitroprussida de sódio (SNP) ou prostaglandina E1 (PGE1). Os resultados mostraram que a inibição da produção de NO reduz o acúmulo de leucócitos e a formação de edema, podendo ser induzida por meio de diferentes mediadores da inflamação. A administração de L-NAME também causou a diminuição local do aporte sanguíneo. Os autores sugeriram que este é o mecanismo que exerce efeito antiinflamatório, neste modelo.

Vespa et al.¹⁷⁷, em 1994, realizaram um estudo para determinar o papel de reagentes intermediários do nitrogênio nas infecções por *Trypanossoma cruzi*. In vitro, reações antígeno-anticorpo obtidas durante a fase aguda de infecção, produziram elevada quantidade de óxido nítrico (NO) que foi correlacionada com a resistência ou suscetibilidade dos animais. In vivo, os níveis de NO₂⁻ mais NO₃⁻ no plasma durante a infecção foram maiores nos camundongos C57BL/6 do que nos camundongos BALBL/c. Os resultados mostraram que com o tratamento de C57BL/6, quando a síntese de óxido nítrico (NO) foi inibida, por meio de inibidores de NO síntase, houve aumento da parasitemia e mortalidade.

Um estudo para determinar se a produção de óxido nítrico (NO) pela ativação de culturas de macrófagos em níveis fisiológicos de arginina, ou por meio do aumento na disponibilidade de arginina como substrato para síntese de NO foi realizado por Norris et al.¹¹⁴ em 1995. A geração de NO pelos macrófagos é responsável pela morte do *Trypanossoma cruzi*. O aumento exógeno de arginina ou citrulina resultou em significativo aumento da produção de NO e da sua completa ação nos parasitas por meio da atividade macrofágica. A citrulina foi substituída totalmente pela arginina no suporte da produção de NO e na atividade de destruição do *Trypanossoma*. Estes resultados demonstraram que na expressão e ativação do ciclo da citrulina, o NO é liberado pelos macrófagos. Os níveis de arginina no plasma são limitados à produção de NO no sangue e pela atividade de destruição do *Trypanossoma* nestas células. Segundo os autores, o aumento dos níveis de

substrato no plasma, em vez de arginina no sangue e biosíntese de NO, pode representar um meio de aumentar a atividade antimicrobiana in vivo.

Em 1997, Lara⁸³ estudou a participação dos constituintes dentários na manutenção do processo de reabsorção dentinária inflamatória. Foram utilizados, nesse estudo, camundongos isogênicos BALB/c e C57B1/6 para avaliação da cinética de migração celular induzida após injeção intraperitoneal de suspensões de esmalte e dentina. A resposta inflamatória tecidual após implantação de lamínulas de vidro tratadas com as suspensões de esmalte e dentina e a atividade funcional de macrófagos peritoneais normais tratados com as suspensões de esmalte e dentina foram avaliados. De acordo com os resultados obtidos, o autor concluiu que, os constituintes dentários, esmalte e dentina, foram capazes de induzir uma resposta inflamatória caracterizada pela migração de neutrófilos e células mononucleadas com diferenciações morfológicas para células epitelióides com produção de citocinas, como IL-1 e o TNF- α e de NO₂⁻ e de H₂O₂.

Leonardo⁹¹, em 1997, mencionou que os reagentes intermediários do oxigênio (peróxido de hidrogênio) e os reagentes intermediários do nitrogênio (óxido nítrico), provenientes da atividade fagocitária, são indicativos de citotoxicidade quando em grande quantidade.

Em 1997, Burney et al.²⁸, investigaram a citotoxicidade do óxido nítrico sobre células de ovário de hamster chinês (CHO-AA8) e linfoblastóides (TK6). Após a aplicação de doses que variaram de 0 a 9 mM de NO por duas horas, os autores constataram que a indução de toxicidade é extremamente complexa, envolvendo caminhos diversos, geralmente levando à morte celular. Os resultados demonstraram que as células TK6 são muito mais suscetíveis à indução da toxicidade que as células CHO-AA8. O primeiro efeito da exposição ao NO foi a inibição da síntese de DNA, devido à quebra de uma das hélices, paralisando o ciclo celular.

A produção moderada de citocinas, H₂O₂ e NO induzida por bactérias lácticas utilizadas na dieta, pode apresentar um efeito benéfico na manutenção do balanço

imunológico e aumento da resistência às infecções, sem a indução de efeitos secundários que ocorrem em tratamentos terapêuticos com citocinas. Todavia, pode-se notar que altas concentrações de TNF- α , H₂O₂ e NO causam caquexia, agressão tecidual, coagulação intravascular disseminada e choque. Portanto, o controle desses mediadores in vivo é muito importante, sendo que uma das vias de controle se dá por meio de estudos experimentais (Park et al.¹²², 1999).

Rasquin¹³⁷, em 2000, avaliou a citotoxicidade dos cimentos endodônticos, Sealapex, Sealer 26, Topseal, Pro Canal e Endomethasone. Com a utilização de um leitor de ELISA foram avaliadas as liberações de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio por meio de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos em contato com soluções de cimentos, nas concentrações de 9 mg/ml e 18 mg/ml. Para o autor, os resultados permitiram observar maiores liberações de NO com os cimentos Topseal, Sealer 26 e Endomethasone, em qualquer uma das concentrações testadas. Entre os cimentos Sealapex e Pro Canal, com as menores liberações de NO, parece não haver diferença entre as concentrações. Entretanto, na concentração de 9 mg/ml todos os cimentos apresentaram liberações bem menores do que na concentração de 18 mg/ml.

Estudos prévios mostraram que a substância P (SP) causa vasodilatação na polpa dental. Kim et al.⁷⁵ em 2001, avaliaram se o SP atua através do óxido nítrico (NO) influenciando o escoamento sanguíneo pulpar buscando, dessa forma, esclarecer o mecanismo intracelular do SP na fisiologia pulповascular. Uma mistura de polpas dentais frescas extraídas de dentes de 5 bovinos foi usada. Após a maceração pulpar, SP, L-Name e nitropussiato de sódio (SNP) foram adicionados ao tecido pulpar. Após incubação por um período de 1, 2, 3 ou 4 horas a 37° C e 100% de umidade, as amostras teciduais foram centrifugadas e o nitrato foi quantificado por meio do método de quimioluminescência. Os dados foram analisados por múltiplas comparações estatísticas, empregando-se o teste ANOVA. As concentrações de 0, 25, 50 e 100 mg/ml de SP, produziram claramente doses dependentes de Óxido Nítrico para cada nível testado ($p < 0,05$). Adicionalmente, para cada concentração de SP, a síntese de NO foi efetivamente bloqueada pelo L-NAME (95 a 99%). Os autores concluíram que a SP promove a estimulação da produção de NO

no endotélio de maneira independente, isto é, a L-NAME não tem efeito de inibição na produção de NO pelo SP.

Gutiérrez⁵⁸ em 2004, avaliou a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos, utilizando o método de Mossmann¹¹¹ quanto à liberação de NO em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Nesse trabalho, concluiu-se que as concentrações de cimentos endodônticos que liberaram NO foram respectivamente, o Endomethasone, seguido de Endo-Rez, Bálsamo do Peru e de Polímero de Mamona. Estes níveis de liberação de NO foram bem mais baixos em relação a citotoxicidade do controle positivo LPS e muito próximos do controle negativo utilizado, o PEG (Polietilenoglicol 400).

Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

A secreção de citocinas é um componente importante na resposta imune inata por mediarem muitas das suas funções efetoras. O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda e é produzido principalmente por macrófagos ativados (Tracey et al.¹⁷¹, 1973; Beutler, Cerami¹⁷, 1986). O TNF- α atua no início da resposta imune, regula a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória e está envolvido em eventos locais e sistêmicos, contínuos à inflamação (Markhatadze⁹⁷, 1998).

Stashenko¹⁵⁵, em 1990 estudou o papel das citocinas na patogênese das lesões periapicais. Componentes bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS), induzem a produção de muitos mediadores polipeptídeos, ou citocinas, pelas células inflamatórias. Estas citocinas, que incluem interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina 1- alfa (IL-1 α) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), derivadas de macrófagos ativados, e uma linfotóxina (TNF- β), derivada dos linfócitos T, têm se mostrado potentes estimuladoras da reabsorção óssea e inibidoras da reparação óssea e inibidoras da reparação *in vitro* e *in vivo*. A reabsorção óssea nas doenças inflamatórias tem sido atribuída à ação do fator ativador de osteoclasto (OAF). A maioria dos componentes do OAF foi purificada e verificou-se ser a IL-1 α , TNF- α , TNF- β , e interações sinérgicas entre estes mediadores, responsáveis pelos 40% restantes da reabsorção óssea.

De acordo com Wellicome et al.¹⁸¹ em 1990, as alterações da superfície das células endoteliais, em resposta às citocinas é de grande importância na regulação da migração celular e no desenvolvimento do processo inflamatório.

McFarlane et al.⁹⁴ em 1990, estudaram a liberação de IL-1 β e TNF- α pela cultura de células mononucleadas em pacientes com periodontite. Monócitos não estimulados de pacientes com periodontite liberaram mais IL-1 β do que pacientes controles durante as primeiras 24 horas de cultura: havendo uma ampla variação na quantidade de IL-1 β liberada (0,45-13,00ng/ml $\times 10^6$ células), a qual não foi relacionada com o grau de perda óssea na bolsa periodontal. Quando estimulados com LPS, os monócitos produziram mais IL-1 β do que os pacientes controles. O TNF- α foi detectado em cultura de células

mononucleadas obtidas em periodontites ($0-765\text{ng/ml} \times 10^6$ células), mas este valor não foi significativamente diferente do encontrado no grupo controle. Já o TNF- α estimulado por LPS, era significativamente maior. Embora o papel preciso da IL-1 β e do TNF- α nas periodontites estejam incertos, os dados acima relacionados indicam que ambas as citocinas podem participar da patogênese da doença periodontal.

Mangan et al.⁹⁶ em 1991, observaram que o LPS, TNF- α e IL-1 β impediram a apoptose (morte celular programada) de monócitos humanos. Os resultados deste trabalho indicaram claramente que os monócitos morrem por apoptose quando cultivados sem estimulação. Quando adicionaram LPS da *Escherichia coli*, que é um potente ativador de monócitos, mesmo em concentrações baixas causaram um aumento na sobrevivência dos monócitos. O mesmo foi observado para a IL-1 β e TNF- α , sugerindo que a apoptose é regulada por certas citocinas. A regulação da apoptose pode ser um importante mecanismo homeostático para controlar o número de monócitos capazes de responder à infecção, cura da ferida e crescimento tumoral.

De acordo com Perala et al.¹²⁴ em 1992, a IL-1 é uma citocina produzida por monócitos e macrófagos a qual, provavelmente, atua mediando alterações imunológicas e endócrinas, associadas à infecção microbiana, agressão tecidual, processos inflamatórios e reabsorções ósseas. Os estímulos para produção de IL-1, incluem microrganismos, LPS, complexo antígeno-anticorpo, corpos estranhos e outras citocinas. O propósito deste estudo foi analisar implantes dentários na estimulação de células mononucleadas a produzirem IL-1 β (também conhecida como fator ativador de osteoclastos) e TNF- α , uma vez que, a produção destas citocinas pode levar à perda óssea e, conseqüentemente, à perda do implante. Os implantes foram incubados em culturas de células mononucleadas (macrófagos) e a liberação de citocinas medida por técnicas de radioimunoensaio. Todos os cinco diferentes tipos de implantes (IMZ recoberto com hidroxiapatita, IMZ de titânio, osseodent de titânio, osseotite recoberto com hidroxiapatita e swedevent de titânio) induziram à liberação de IL-1 β e TNF- α , sendo os implantes revestidos com hidroxiapatita os que apresentaram maior liberação.

Vassalli¹⁷⁶ em 1992, numa revisão da literatura sobre o TNF, observou que ele pode agir em células como um agente protetor ou prejudicial, dependendo do sinergismo com outras citocinas, da quantidade liberada e do tempo de exposição.

Mangan et al.⁹⁵ em 1993, observaram o efeito da apoptose em monócitos humanos relacionado à doenças inflamatórias crônicas. A apoptose é uma forma fisiológica de morte celular que é profundamente influenciada pelo meio extracelular. Apoptose difere de necrose (que é a morte patológica de morte celular) pois a célula incha e morre. A capacidade de induzir a apoptose seletivamente em leucócitos, parece ser um importante mecanismo fisiológico para controlar o acúmulo dessas células nas lesões inflamatórias. Monócitos humanos contribuem, tanto para a persistência, como para a resolução da inflamação crônica. A apoptose pode ser iniciada quando os monócitos são cultivados na ausência de estímulos exógenos. Portanto, ela pode ser inibida pela presença de produtos microbianos como LPS, ou por certas citocinas pré-inflamatórias como IL-1 e TNF- α . Citocinas derivadas dos linfócitos T auxiliares (células T auxiliares tipo 1), como por exemplo o interferon gama (IFN- γ), inibem a apoptose, enquanto aquelas células derivadas dos linfócitos T auxiliares tipo 2 (por exemplo a IL-4), realçam a apoptose em monócitos ativados. A capacidade de regular terapêuticamente a apoptose dos monócitos parece ter alto valor na promoção da cura rápida ou redução da imunopatogênese da inflamação crônica.

Stashenko et al.¹⁵⁶ em 1994, estudaram o mecanismo da patogênese das lesões periapicais usando ratos como modelo experimental, expondo a polpa cirurgicamente. Nesses modelos, as lesões periapicais desenvolveram-se rapidamente entre zero e 15 dias (fase aguda) e mais lentamente na fase crônica. A microbiota Gram-negativa, semelhante em humanos, foi rapidamente estabelecida. Nas lesões periapicais encontraram linfócitos T, neutrófilos, linfócitos B (células B), macrófagos e plasmócitos. Os linfócitos T auxiliares (Th) predominaram durante a fase aguda, enquanto os linfócitos T supressores (Ts) foram encontrados com maior frequência na fase crônica. A maior parte da atividade de reabsorção óssea foi medida pela IL-1 α . Prostaglandinas responderam por 10 a 15% da atividade de reabsorção. Células que expressam IL-1 α foram identificadas na polpa após o

segundo dia de exposição e, nos tecidos periapicais após o sétimo dia de exposição. Células que expressam TNF- α foram também detectadas, no entanto, células que expressam IL-1 β ou TNF- β estavam ausentes. Finalmente, a destruição óssea periapical foi inibida em 60% pelo tratamento com o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra).

Agarwal et al.¹ em 1995, pesquisaram a expressão diferencial de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em monócitos humanos em resposta ao LPS de diferentes patógenos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porfiromonas gengivalis* e *Escherichia coli*. Os monócitos humanos quando ativados pelo LPS, responderam com magnitudes diferentes, dependendo da origem do LPS e da quantidade presente. A liberação de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 foi observada.

A principal função do TNF- α é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção e ativar estas células a erradicar os microrganismos. O TNF- α também atua como um pirogênio endógeno, induzindo febre por aumentar a síntese de prostaglandinas (Beutler¹⁶, 1995).

Cassatella³³ em 1995, realizou uma revisão da literatura pela controvérsia em relação à liberação ou não de citocinas pelos neutrófilos polimorfonucleados (PMNs). É sabido que, linfócitos T, células exterminadoras naturais (NK), monócitos/macrófagos, são as principais células produtoras de citocinas. No entanto, nos últimos anos, trabalhos mostram que os PMNs também têm a capacidade de sintetizar e liberar citocinas imunorreguladoras, como o TNF- α , IL-1 β , receptor antagonista para interleucina-1 (il-1ra), IL-8 e fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- β_1), além de outras. Sabemos que os PMNs são células de vida curta, incapazes de proliferação ou de renovação. Assim, sua capacidade para sintetizar citocinas imunomoduladoras pode ser vista como um fenômeno de pequena significância fisiológica. No entanto, trabalhos mostram que a sobrevivência dos PMNs pode ser entendida pela exposição a microambientes distintos envolvidos na infecção e imunidade. Neste cenário, os PMNs poderiam ser considerados, não somente um elemento central ativo na resposta inflamatória, mas também uma célula que, através da secreção de citocinas, pode influenciar a direção e evolução do processo imune.

Quintero et al.¹³⁵ em 1995, observaram que células do ligamento periodontal são capazes de sintetizar citocinas em resposta ao LPS de microrganismos Gram-negativos. O tratamento das células do ligamento periodontal com TNF- α inibiram a expressão de células com características de osteoblastos (fenótipo). Em consequência desta mudança fenotípica induzida pelo TNF- α , as células do ligamento periodontal tornaram-se LPS receptivas e, em resposta, sintetizaram várias citocinas pré-inflamatórias. Esta mudança de fenótipo ocorreu em concentrações de TNF- α que são freqüentemente observadas em exudatos durante a inflamação periodontal. Portanto, o TNF- α induziu mudanças fenotípicas que ocorreram com as células transitórias do ligamento periodontal participando, assim, diretamente do processo da doença periodontal.

Tani-Ishii et al.¹⁶¹ em 1995, verificaram a relação entre citocinas responsáveis pela reabsorção óssea e a presença das possíveis células que as expressam. Citocinas relacionadas à reabsorção óssea, IL-1 e TNF, têm sido relacionadas na patogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas, incluindo pulpites e periodontites apicais. Os autores identificaram células que expressam IL-1 α e TNF- α em polpas expostas infectadas e durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos. Detectaram por imunohistoquímica, IL-1 α e TNF- α presentes no segundo dia, tanto na exposição pulpar quanto na região periapical. O número destas citocinas aumentou no quarto dia, na polpa e depois do trigésimo dia, no periápice. As células que expressam IL-1 α e TNF- α foram identificadas como macrófagos e fibroblastos com ocasionais marcadores para os leucócitos polimorfonucleados. Entretanto, linfócitos não foram identificados. Portanto, os achados demonstraram que as células que expressam estas citocinas (IL-1 α TNF- α) estão presentes imediatamente após a exposição pulpar neste modelo de estudo, com a forte hipótese delas serem os mediadores chave da patogênese pulpar e periapical, incluindo a destruição óssea.

Rossi et al.¹⁴¹ em 1996 realizaram um estudo sobre a produção de IL-1 β e TNF- α por monócitos em cultura de L-Tiroxina (T4) e Tirocalcitonina (TCA), relacionados com a reabsorção radicular. O objetivo deste estudo foi determinar se a T4 e a TCA influenciavam os monócitos na produção de IL-1 β e TNF- α , utilizando monócitos de um grupo de pacientes que estavam em tratamento ortodôntico e com severa reabsorção radicular.

Nenhum hormônio induziu significativamente a liberação de TNF- α , ao contrário, o TCA teve um efeito inibitório, não estimulando a liberação de TNF- α por monócitos. Estes dados sugerem que pacientes com reabsorção não diferem do controle, em atenção aos parâmetros de citocina, e, portanto, *in vitro*, os níveis de IL-1 β e TNF- α podem não distinguir as reabsorções.

Ko, Lim⁷⁷ em 1997, verificaram os níveis de citocinas na patogênese de tecido pulpar e periapical. Este estudo examinou os níveis de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α em polpas dentárias humanas inflamadas e lesões periapicais, e determinaram a relação entre cada citocina e a patogênese pulpar e periapical. As polpas utilizadas neste experimento foram obtidas na rotina do tratamento endodôntico, e as lesões periapicais nas cirurgias parendodônticas. Os espécimes foram divididos em quatro grupos: polpa normal, pulpíte aguda, pulpíte crônica e lesão periapical. Cada espécime foi armazenado em nitrogênio líquido. As citocinas foram mensuradas pelo leitor de ELISA. As concentrações de IL-1 α foram maiores no grupo das lesões periapicais do que no grupo da pulpíte aguda, sendo, neste grupo, maior do que o da pulpíte crônica. As concentrações de TNF- α nos grupos da pulpíte aguda e crônica foram maiores do que no grupo das lesões periapicais, porém, todas foram estatisticamente significativas para o grupo controle. Estes resultados sugerem que a concentração de cada citocina aumenta com o avanço da doença pulpar, e a IL-1 α pode exercer a mais importante função na progressão das doenças periapicais do que nas doenças pulpares, e o TNF- α nas doenças pulpares do que nas doenças periapicais.

A destruição do osso periapical é uma importante seqüela da infecção pulpar. Recentes descobertas têm demonstrado que a maior atividade de reabsorção óssea periapical em ratos, pode ser neutralizada com soro anti-IL-1. Wang et al.¹⁷⁹ em 1997, estudaram 20 dentes molares de ratos Sprague-Dawley, os quais foram abertos para permitir a infecção via oral. Células foram isoladas em tecidos de lesões periapicais (granulomas) obtidas 3, 7, 15 e 30 dias após a exposição. IL-1 α e TNF- α RNA foram ambos expressos durante os 7 dias, crescendo no 15º dia e declinando após 30 dias. Em contraste, a IL-1 β RNA foi expressa em níveis bem menores, mas com cinética similar. Os resultados demonstraram que a IL-1 α e o TNF- α são altamente expressados no

desenvolvimento das lesões periapicais em ratos e confirmam os estudos prévios de proteína neste modelo.

Yoshimura et al.¹⁸⁴ em 1997, estudaram a secreção de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-1 por leucócitos humanos em resposta ao LPS de bactérias da doença periodontal. Os leucócitos PMNs são as primeiras células de defesa a migrarem para o tecido periodontal em resposta aos patógenos. Recentemente foi demonstrado que leucócitos PMNs possuem a habilidade de sintetizar e liberar citocinas seguindo uma apropriada estimulação. No momento, não é claro se esta capacidade está diretamente relacionada ao processo de destruição periodontal. Foi, então, estudada a quantidade de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-1), receptor antagonista para interleucina-1 (IL-1ra) secretada pelos PMNs sadios e seguidos da estimulação com LPS por quatro bactérias que causam periodontite: *Porfiromonas gengivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga ochracea* e *Fusobacterium nucleatum*, e a bactéria não oral *Escherichia coli*. Os diferentes níveis de secreção destas citocinas e suas atividades biológicas induzidas por vários tipos de LPS podem ser importantes no início e na progressão da doença periodontal.

A liberação do TNF- α por monócitos após a exposição ao hidróxido de cálcio [Ca(OH₂)] e LPS da *Escherichia coli* foi estudado por Barthel et al.¹¹ em 1997. O LPS é um componente da parede celular das bactérias Gram-negativas anaeróbias, e tem sido relacionado com a patogenia da doença periodontal, resultando na infecção do canal radicular. O hidróxido de cálcio tem se mostrado um medicamento efetivo em infecções deste nível, reduzindo a microbiota dentro do canal e tem sido proposto que seu efeito terapêutico pode, também, ser resultado da inativação direta do LPS. A proposta deste estudo foi analisar se o LPS da *Escherichia coli* pode ser reduzido ou eliminado com Ca(OH₂). Quatro concentrações de LPS da *Escherichia coli* foram colocados em com 25mg de Ca(OH₂) em água estéril. O grupo controle ficou com LPS e água sem Ca(OH₂). Os resultados indicaram que o Ca(OH₂) foi capaz de eliminar o efeito tóxico do LPS da *Escherichia coli* e estimular a produção de TNF- α pelos monócitos.

Fouad⁴⁶ em 1997 estudou a expressão de IL-1 α , TNF- α no início das lesões periapicais em ratos normais e imunodeficientes. Os linfócitos T auxiliares e os linfócitos B podem contribuir no mecanismo que resulta na reabsorção óssea, produção de citocinas e na lesão periapical. Ratos com imunodeficiência combinam baixa função dos linfócitos B e T. O autor se propôs a investigar a progressão da necrose pulpar e as combinações histomorfométricas das lesões periapicais em ratos normais em comparação com ratos com severa imunodeficiência. A liberação de citocinas IL-1 α , TNF- α e a presença de reabsorção óssea foram também investigadas. As polpas dos primeiros molares foram expostas ao meio ambiente por 1, 2, 3 e 4 semanas. Três blocos de tecido mandibular e estruturas de suporte foram processados para as duas análises, tanto a microscópica, como a do teste imunohistoquímico para IL-1 α e TNF- α , mostrando progressão da necrose pulpar e, conseqüentemente, das lesões periapicais nos dois modelos de estudo. As lesões periapicais de ratos com imunodeficiência eram significativamente inferiores à de ratos normais a partir da terceira semana. O autor concluiu que a patologia pulpar e periapical era independente da presença dos linfócitos T e B neste modelo.

Assuma et al.⁸ em 1998, verificaram a inibição da resposta inflamatória e da perda óssea na periodontite experimental através dos antagonistas da IL-1 e do TNF. Sabe-se que a doença periodontal é a maior causa da perda dos dentes em humanos e, na maioria das vezes, associada com a perda óssea, incluindo a osteoporose. A destruição periodontal é iniciada pela colonização bacteriana na superfície dentária, iniciando a inflamação e a reabsorção óssea. Para avaliar o papel da IL-1 e do TNF, neste processo, estudos foram conduzidos em macacos para desenvolver a periodontite experimental. Receptores solúveis que bloqueiam a função para IL-1 e TNF foram aplicados por meio de injeção local nos sítios da doença periodontal induzida, para comparar, com outros sítios, onde injetaram apenas o veículo. Os resultados indicaram que a injeção de receptores solúveis para IL-1 e TNF inibiram em aproximadamente 80% o recrutamento de células inflamatórias nas proximidades do osso. A formação de osteoclastos foi reduzida em 67% comparada ao grupo controle e a perda óssea reduzida em 60%. Estes achados indicam que um componente significativo do processo patológico da periodontite é devido à atividade da IL-1 e TNF.

Graves et al.⁵⁵ em 1998, estudaram a presença de IL-1 e TNF na progressão da gengivite, para periodontite. Sabe-se que a doença periodontal causa a perda dos dentes humanos, estando associada à perda óssea. Seguida da invasão bacteriana, a gengiva torna-se inflamada e, em alguns casos, progride para a destruição do osso alveolar. Para investigar a movimentação das células inflamatórias para o osso alveolar e o papel das citocinas IL-1 e TNF, neste processo, os autores usaram um modelo primata (macaco) para desenvolver uma periodontite experimental. A atividade da IL-1 e TNF foi inibida pela aplicação local de receptores solúveis para IL-1 e TNF por meio de uma injeção na papila dentária. Os resultados indicaram que a progressão das células inflamatórias para o osso alveolar associada à formação osteoclástica, foi inibida pelos bloqueadores para IL-1 e TNF. Com este resultado, os autores sugeriram que a conversão da gengivite para a periodontite está diretamente relacionada com o movimento do infiltrado inflamatório para o osso alveolar, e esta atividade está, pelo menos parcialmente, dependente da IL-1 e/ou TNF.

O'Boskey, Panagakos¹¹⁶ em 1998, estudaram o papel das citocinas na produção da matriz metaloproteinase por células da polpa humana. Interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são citocinas inflamatórias secretadas por monócitos/macrófagos ativados, sendo potentes indutores da reabsorção tecidual *in vitro*. Elevados níveis destas proteínas têm sido encontrados em conhecidas áreas com resposta inflamatória devido à infecção bacteriana ou pela presença de patógenos, como os encontrados no espaço do sulco gengival na doença periodontal. IL-1 e TNF- α têm estimulado a síntese e secreção de enzimas proteolíticas – especialmente plasminogênio e matriz metaloproteinase (MMP), destruindo a matriz extracelular (ME), assim como diminui a regulação da síntese de proteínas que são essenciais para a formação da ME, como o colágeno e a fosfatase alcalina. Células tratadas com essas citocinas mostraram alterações no ritmo de proliferação, diferenciação e síntese e secreção de proteínas formadoras de matriz. Este estudo demonstrou que essas citocinas estimularam a produção de elevados níveis de MMP pelas células da polpa humana, em culturas de longa duração, e que essas MMP podem desempenhar uma função crítica na patogênese da inflamação pulpar. Durante os estágios crônicos da inflamação pulpar, elevados níveis de citocinas têm

o potencial de estimular a secreção pelas células da polpa da MMP, a qual pode destruir a ME presente na cavidade pulpar. Esta MMP tem, também, o potencial de degradar síntese da pré-dentina, impedindo sua mineralização e inibindo o processo de formação de dentina reacional.

Kawashima, Stashenko⁷³ em 1999, verificaram a relação entre a reabsorção óssea e citocinas reguladoras, na infamação periapical induzida em camundongos. A destruição óssea periapical precoce mediada pela IL-1 α em camundongos é conhecida. A produção e ação da IL-1 α é modulada por uma rede de citocinas, as quais são produzidas por linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), e células residentes do tecido conjuntivo. Este estudo observou a cinética da expressão de dez citocinas em lesões periapicais induzidas em camundongos. Os resultados indicaram que a rede de citocinas é ativada no periápice em resposta à infecção bacteriana, e que as reações pré-inflamatórias moduladas pelos linfócitos Th1, podem predominar durante a destruição óssea periapical.

Kobayashi et al.⁷⁸ em 1999, estudando a produção intracelular de IL-1 α de fibroblastos gengivais humanos, em resposta a várias citocinas, verificaram que citocinas pré-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α , podem induzir a bioatividade intracelular da produção de IL-1 α em fibroblastos gengivais humanos, e que esta produção pode ser modulada diferentemente pelas citocinas derivadas dos linfócitos T, como o interferon gama (IFN- γ) ou IL-4.

Tani-Ishii et al.¹⁶² em 1999, estudaram in vitro o papel da IL-1 α e TNF- α em cultura de osso medular de ratos e colônias de osteoclastos formados. Observaram a estimulação osteoclástica e reabsorção óssea mediadas por essas citocinas. São, portanto, mediadores das respostas inflamatórias sistêmica e local e podem agir na indução local de osteólise como foi observado adjacente a sítios inflamados.

A liberação do TNF- α em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos, na presença de cimentos endodônticos em diferentes concentrações 25mg/ml e 100mg/ml, foi avaliada por Perassi¹²⁵ em 2000. Foram experimentados o Sealapex, Endomethasone e seus

respectivos componentes. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio não liberou ou liberou baixas unidades de TNF- α , já o óxido de zinco e eugenol estimulou a liberação de altas quantidades.

Interferon Gama (IFN- γ)

O desenvolvimento da função de defesa do hospedeiro por macrófagos é mediado, em parte, por um sinal conhecido como fator ativador de macrófagos (MAF). O IFN- γ é um potente MAF que estimula a expressão várias proteínas de membranas, aumentando ou diminuindo a síntese e secreção de múltiplas enzimas, ressaltando o potencial gerador de reativos intermediários do oxigênio (Hamilton et al.⁵⁹ 1985).

O Óxido Nítrico é produzido em resposta a citocinas, tais como TNF- α e IFN- γ (Janeway et al.⁶⁸ 1997).

O IFN- γ foi originalmente definido como um agente com ação antiviral, mas suas propriedades incluem a regulação de vários aspectos da resposta imune, como a estimulação da atividade microbicida dos macrófagos, estimulação da apresentação de antígenos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal, coordenação das interações entre os leucócitos e o endotélio, efeitos na proliferação celular e na apoptose, bem como, na estimulação e repressão de vários genes, cuja significância funcional, ainda permanece obscura (Boehm et al.²¹ 1997).

A ativação dos macrófagos é um fenômeno complexo e, quando ativados, apresentam capacidade aumentada de destruir certos microrganismos. Os macrófagos respondem a vários microrganismos pela secreção de IL-12, que induz à produção local de IFN- γ pelas células NK e linfócitos. O IFN- γ ativa os macrófagos a destruir os microrganismos fagocitados por estimular a síntese de intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio (Stark et al.¹⁵⁴ 1998).

Os efeitos imunorreguladores do IFN- γ influenciam vários efeitos biológicos por ativar positiva ou negativamente a expressão de muitos genes e proteínas (Gessani et al.⁵² 1998).

Macrófagos ativados via IFN- γ são capazes de gerar TNF- α , IL-6, IL-12 e Óxido Nítrico que aumentam a capacidade dessas células em controlar o desenvolvimento de

patógenos. A estimulação de IFN- γ resulta da ativação iNOS que produz o NO (Brennan et al.²⁷ 2004).

CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Sealapex

Holland, Souza⁶¹ em 1985, visando testar a capacidade de um novo cimento obturador com à base de hidróxido de cálcio (Sealapex) na indução da formação de tecido mineralizado, efetuaram estudo histológico, utilizando 160 canais radiculares de 8 cães com 2 anos de idade e 80 canais radiculares em 4 macacos adultos. A remoção da polpa radicular foi realizada em dois diferentes níveis, 1mm aquém do ápice radiográfico e ao nível do ápice radiográfico. Os canais foram obturados com cones de guta-percha e cimento Sealapex ou Kerr Pulp Canal Sealer, ou ainda com pasta formada por hidróxido de cálcio e água destilada. Alguns canais radiculares foram mantidos vazios, servindo de grupo controle. Após o período de 180 dias, os resultados observados, em dentes de cães e macacos, foram semelhantes e mostraram que o Sealapex e a pasta de hidróxido de cálcio com água destilada induziram o fechamento apical, pela deposição cementária. Esse selamento foi mais freqüente nos casos em que a pulpectomia foi realizada 1mm aquém do ápice radiográfico. Nos casos em que ocorreu extravasamento do material, tanto o Sealapex como o Kerr Pulp Canal Sealer provocaram reação inflamatória crônica no ligamento periodontal. Porém, com o Sealapex, freqüentemente ocorreu a deposição de tecido osteóide na área do extravasamento ou, então, onde ele era reabsorvido. O grupo controle mostrou alguns casos de fechamento apical, sugerindo que ele poderia ocorrer sem o uso de materiais obturadores, desde que a assepsia fosse mantida durante todo o tratamento.

Zmener, Cabrini¹⁸⁶ em 1987, usando cultura de linfócitos e monócitos humanos, avaliaram os efeitos do CRCS, Sealapex e Dycal, interpretando os resultados por meio da adesão dessas células no material testado, assim como a variação na sua morfologia. Numa ordem crescente de efeitos adversos, observaram a seqüência Sealapex, CRCS e Dycal, considerando este último o menos compatível em razão do seu elevado pH, e o CRCS pelo fato de apresentar eugenol e eucaliptol em sua composição.

Leal et al.⁸⁴ em 1988, estudaram a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos CRCS, Sealapex, N-Rickert e Fillcanal. Os cimentos foram espatulados, colocados no interior de tubos de polietileno e implantados no tecido subcutâneo de um mesmo rato, em

sistema de rodízio. Os períodos de observação foram de 7, 21 e 60 dias. De um modo geral, os materiais implantados mostraram-se irritantes, provocando reações inflamatórias de diferentes intensidades. Assim, no período inicial, o Sealapex e o N-Rickert exibiram uma reação tecidual moderada, enquanto que com o CRCS e Fillcanal, essa reação foi intensa. Na fase final, houve uma diminuição do processo inflamatório, onde os autores observaram, com o Sealapex, o CRCS e o N-Rickert, discreta reação tecidual, enquanto que com o Fillcanal foi observada uma reação mais acentuada.

Em 1988, Tronstad et al.¹⁷² avaliaram a solubilidade e a biocompatibilidade de cimentos endodônticos contendo hidróxido de cálcio, Sealapex e CRCS, de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol convencional e de uma pasta de hidróxido de cálcio e soro fisiológico, acondicionados em cilindros de Teflon, e, posteriormente, implantados em perfurações efetuadas no tecido ósseo de mandíbula de cães. Decorridos 90 dias, os animais foram sacrificados, os segmentos ósseos contendo os cilindros de Teflon removidos, incluídos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina e eosina. Os resultados da análise histopatológica mostraram que, no grupo da pasta de hidróxido de cálcio e soro fisiológico, ela havia sido completamente solubilizada. Os cilindros foram preenchidos com tecido ósseo, não sendo observado processo inflamatório nos tecidos adjacentes. No grupo do cimento Sealapex, ele havia sido parcialmente solubilizado e, na maioria dos casos, substituído por tecido conjuntivo, com severa reação macrofágica e leve reação inflamatória. Em todos os casos analisados, o CRCS e o cimento de óxido de zinco e eugenol permaneceram nos cilindros, sem invaginação de tecido para o interior dos mesmos. Nenhuma reação macrofágica foi vista, porém, severa reação inflamatória foi causada pelo CRCS, enquanto que reações inflamatórias suaves foram provocadas pelo cimento de óxido de zinco e eugenol.

Yesiloy et al.¹⁸³ em 1988, avaliaram a citotoxicidade de vários cimentos obturadores de canais radiculares injetados em tecido subcutâneo de 12 porcos da Índia. Foram avaliados os cimentos de Grossman, Eucapercha, Endo-Fill, CRCS, Sealapex e Hypocal, sendo utilizado, como controle uma solução salina estéril. Após um período experimental de 6,15 e 80 dias, os animais foram sacrificados e as peças obtidas coradas pela

hematoxilina e eosina e pelo método de Von Kossa. A análise histológica mostrou que o Sealapex e o Endo-Fill apresentaram menor reação inflamatória do que qualquer outro material testado. O cimento de Grossman, o CRCS e o Hypocal revelaram, predominantemente, reações inflamatórias severas em quase todos os períodos de tempo, exceto aos 80 dias. Calcificações difusas foram induzidas principalmente pelas preparações à base de hidróxido de cálcio, CRCS, Sealapex e Hypocal. Eucapercha e Endo-Fill apresentaram reduzidas áreas localizadas de calcificação.

Matsumoto et al.⁹⁹ em 1989, compararam a citotoxicidade de cimentos que não continham eugenol na fórmula (New A, New B e New B-2), com cimentos endodônticos convencionais (AH26, Diaket, Canals, Tubli-Seal e Sealapex). Foram usadas células da polpa dentária de 6 ratos Wistar obtidas através de cultura primária de células. Os cimentos foram analisados antes e após o endurecimento. Foi incorporada Timidina tritiada no DNA celular. Nos experimentos com cimentos já endurecidos, as mudanças da morfologia celular foram analisadas por microscópio de fase. Os resultados mostraram que os cimentos New A, New B e New B-2 recém manipulados, mostraram toxicidade mínima na síntese de DNA. O Sealapex foi pouco inibidor, também. Houve inibição da síntese de DNA nos cimentos Tubli-Seal e Canals; nos cimentos AH26 e Diaket, ocorreu inibição quase total da síntese de DNA. Após o endurecimento, o cimento New B não alterou a morfologia celular, o Diaket causou deformação na forma dos núcleos. Os autores constataram, que os novos cimentos, sem eugenol, são menos tóxicos em comparação aos cimentos endodônticos convencionais. Aqueles cimentos à base de resina foram os mais tóxicos. A toxicidade aumentou na seguinte ordem: New B, New B2, New A, Sealapex, Canals, Tubli-Seal, AH26 e Diaket no grupo dos recém manipulados; e New B, New A, Diaket, Canals, AH26, Tubli-Seal e Sealapex no outro grupo.

Tagger, Tagger¹⁵⁷ em 1989, efetuaram estudo histológico em dentes de macacos, com o objetivo de avaliar, a longo prazo, a resposta dos tecidos periapicais aos cimentos que contêm hidróxido de cálcio, CRCS e Sealapex, comparados ao cimento AH26. Foram empregados incisivos e segundos pré-molares inferiores, os quais tiveram seus canais radiculares instrumentados e obturados com cones de guta-percha e os cimentos em estudo.

Os animais foram sacrificados após o período de 7, 8 e 14 meses. Os resultados histológicos mostraram uma resposta inflamatória de moderada a severa na região apical das raízes obturadas com AH26 e CRCS. A maior parte dos espécimes relativos ao Sealapex não apresentou células inflamatórias, exceto macrófagos com partículas do cimento obturador. Ainda, com relação ao Sealapex, foi observada uma tendência à obliteração apical por tecido calcificado, aparentemente após a reabsorção do material obturador. Os autores ressaltaram que, apesar dos bons resultados obtidos com o Sealapex, tornam-se necessárias pesquisas adicionais, com o fim de testar o material em canais infectados. Sugeriram, ainda, que a capacidade do cimento de ser reabsorvido, era uma vantagem quando de sua substituição por tecido calcificado, sendo uma desvantagem a sua não reabsorção.

Boneti Filho²³ em 1990, avaliou a biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares: 1) Clássica (Fill Canal), 2) Biológica controlada (Fill Canal), 3) com colocação apical de hidróxido de cálcio (Fill Canal) e 4) Clássica (Sealapex). Utilizou 82 canais de 5 cães. Um alargador de nº20 foi introduzido no canal radicular até atingir o batente apical e foi iniciado o processo de arrombamento, com um alargador nº30, e o limite da perfuração foi de 2mm além do comprimento inicial estabelecido. A instrumentação foi realizada no batente apical, com alargadores e limas Hedstroën até o de nº60. Os canais foram secos com pontas de papel absorventes e obturados com cones de guta-percha principais e auxiliares, de acordo com as quatro técnicas mencionadas. Todas as câmaras pulpare foram fechadas com amálgama. Dez canais, foram instrumentados, mas não obturados, para servirem como grupo controle. Após 180 dias, os cães foram mortos, as peças descalcificadas, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica. As análises dos resultados, pela avaliação da biocompatibilidade, permitiram a seguinte classificação, de acordo com o grau de sucesso: 1) Técnica Clássica (Sealapex), 2) Colocação apical de hidróxido de cálcio (Fill Canal) e Técnica Biológica controlada (Fill Canal), 3) Técnica Clássica (Fill Canal) e 4) Grupo controle.

Meyron, Brook¹⁰² em 1990, estudaram a citotoxicidade dos seguintes cimentos: Kloropercha, Biocalex, Diaket, Endomethasone, AH26 com e sem prata, Sealapex, Tubli Seal, Pulp Canal Sealer, Forfenan, Spad e pasta Kri. Foram utilizados, neste estudo, fibroblastos do ligamento periodontal. A citotoxicidade foi avaliada com e sem a presença de fragmentos de dentina, obtidos com auxílio de uma peça de mão Micro Mega 3000. Os fragmentos eram compactados até obter-se espessuras de 0,5, 1 e 2 mm. Na ausência de dentina, Kloropercha, Biocalex, Dziaket e Endomethasone foram levemente citóxicos. AH26 com e sem prata, Sealapex, Tubli Seal e o Pulp Canal Sealer foram moderadamente citóxicos, enquanto que o Fornefan, Spad e a pasta Kri foram intensamente citotóxicos. Na presença de dentina a citotoxicidade desses materiais foi consideravelmente reduzida, em exceção do Endomethasone, Forfefan, Spad e da pasta Kri.

Soares et al.¹⁵¹ em 1990, analisaram a resposta dos tecidos periapicais a cimentos obturadores de canais radiculares que contêm hidróxido de cálcio. Testaram os cimentos Sealapex e CRCS, utilizando 120 canais radiculares de dentes de cães. Após a instrumentação dos canais, estes foram divididos em três grupos e obturados pela técnica da condensação lateral ativa, com cones de guta-percha e o cimento mais o de óxido de zinco e eugenol, este usado como controle. Decorridos 30 e 180 dias, os animais foram sacrificados e as peças obtidas foram submetidas ao processamento histológico. Os cimentos Sealapex e CRCS causaram resposta tecidual periapical semelhante à encontrada com o cimento de óxido de zinco e eugenol, com resposta mais acentuada nos espécimes em que ocorreu extravasamento do material obturador. Nos casos em que o material obturador estava presente no “batente apical”, constatou-se invaginação de tecido conjuntivo com células inflamatórias crônicas. A deposição de tecido duro com fechamento parcial da abertura apical foi observada para os três cimentos estudados. Nos grupos do Sealapex e CRCS, partículas de cimento foram vistas distantes do ápice. Todos os casos de extravasamento levaram à reação inflamatória crônica dos tecidos apicais.

Takahara et al.¹⁵⁹ em 1990, avaliaram, nos períodos de 24 e 48 horas, a citotoxicidade dos cimentos New A, New B-1, New B-5 e New B-6 (contendo ácidos graxos em substituição ao eugenol), Tubli-Seal, Diaket A, AH26, Canals e Sealapex,

recém-espaturados. Os cimentos foram acondicionados em tubos de polietileno e colocados em contato com culturas de células de tecido ósseo de ratos Wistar, sendo a citotoxicidade avaliada por meio dos seguintes parâmetros: medida de incorporação de timidina radioativa, medida da atividade de fosfatase alcalina, medida da síntese de DNA, medida da quantidade de proteína, observação da morfologia celular e medida da liberação de cálcio. Como controle foram utilizados tubos de polietileno vazios. Os autores constataram que a síntese de DNA foi inibida frente a todos os cimentos estudados. A inibição da atividade da fosfatase alcalina nas células expostas aos cimentos Diaket A, AH26, Canals e Tubli-Seal ocorreu intensamente nos dois períodos experimentais, sendo inibida, em menor grau, no Sealapex. Os novos cimentos testados (New B-1, New B-5, New B-6 e New-A) apresentaram resultados semelhantes aos do controle. Todos os cimentos induziram alterações morfológicas sobre as células, bem como, diminuindo a densidade celular. As menores alterações foram observadas com os cimentos New B-6 e New A. A maior liberação de íons cálcio, nos dois períodos experimentais, foi observada nos cimentos New B-1 e New B-5, sendo que, no Sealapex, essa liberação foi muito semelhante à encontrada no grupo controle. Os autores concluíram que os cimentos New A, New B-1, New B-5 e New B-6, apresentaram, nesse experimento, menor citotoxicidade *in vitro* que os cimentos comercialmente disponíveis.

Zmener et al.¹⁸⁷ em 1990, analisaram a resposta tecidual de um cimento experimental com hidróxido de cálcio após implante em tecido conjuntivo subcutâneo de rato. O material em estudo constituiu do Sealapex sem dióxido de titânio, retirado de sua fórmula original, em função da provável relação de sua presença com a reação do corpo estranho causada pelo cimento. O material foi colocado em tubos de silicone e implantado no tecido subcutâneo de 30 ratos. Os animais foram sacrificados após 7, 30 e 90 dias para a análise histométrica e quantitativa. O exame microscópico demonstrou diferentes graus de alteração dos tecidos frente ao material testado. Tecido granulomatoso contendo numerosas células gigantes do tipo corpo estranho e macrófagos, contendo partículas em seu citoplasma, foi detectado em contato com o material experimental. Fibroblastos e vasos recém formados também foram observados. Essas reações aumentaram, progressivamente, aos 30 e 90 dias de observação.

Leonardo⁹⁰ em 1992, avaliou microscopicamente, em dentes de cães, a reação dos tecidos apicais e periapicais, após a obturação de canais radiculares com dois cimentos que contêm hidróxido de cálcio, Sealapex e CRCS. Foram utilizadas, no trabalho, 16 raízes de pré-molares inferiores de 2 cães sem raça definida, com idade aproximada de 1 ano. Após o arrombamento do delta apical, os canais radiculares foram instrumentados no comprimento do início do delta apical e obturados com cones de guta-percha e com os cimentos em estudo. Decorrido o período experimental de um ano, os animais foram sacrificados e as peças obtidas preparadas para o exame microscópico. Os resultados obtidos demonstraram que ambos cimentos, Sealapex e CRCS, causaram uma inflamação crônica, de magnitude moderada, e induziram a deposição de tecido mineralizado na região apical. No grupo do CRCS, a deposição de tecido mineralizado ocorreu diretamente na sua superfície. Desta forma, o CRCS pareceu ter se comportado biologicamente melhor que o Sealapex, porém, sem diferença estatisticamente significativa.

Molloy et al.¹⁰⁷ em 1992, avaliaram a tolerância tecidual de dois cimentos endodônticos resinosos experimentais, um deles acrescido de prata, por meio de estudo comparativo com outros quatro cimentos: Sealapex, Kerr Pulpa Canal Sealer, AH26 e cimento de Roth. Cada cimento, após a manipulação, era levado ao interior de tubos de polietileno, que eram implantados no tecido subcutâneo de ratos Sprague-Dawley. Decorridos os períodos de 3, 10, 20, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e as peças obtidas preparadas para o exame histológico. A análise dos resultados mostrou que todos os cimentos demonstraram inicialmente inflamação suave, que cessou rapidamente. Em todos os tempos estudados, não ocorreu diferença entre os cimentos, exceto para o AH26, que manteve algum edema até o período de 30 dias. Aos 60 dias, todos os materiais se mostravam compatíveis entre si.

Hetem et al.⁶⁰ em 1993, avaliaram a biocompatibilidade, *in vitro*, dos cimentos Sealapex, AH26, CRCS e óxido de zinco e eugenol, em germes dentários de molares de camundongos albinos, com 14 ou 17 dias, empregando três diferentes metodologias. Os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante e condensados em

um molde de silicone, em forma de disco. Em seguida, os discos de cada cimento foram testados, de três maneiras diferentes: 1) Os discos, após o período de presa, foram colocados no meio de cultura, no qual os germes foram cultivados; 2) Os discos foram colocados em placas de Petri, contendo meio de cultura, e utilizados após um período médio de 15 dias de incubação em estufa; 3) Os germes dentários foram cultivados no líquido onde os discos ficaram depositados durante 15 dias. Decorridos 6 dias, os germes foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, cortados com 6µm de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina, para análise em microscopia ótica. De acordo com os resultados obtidos, todos os cimentos analisados mostraram-se incompatíveis com o desenvolvimento dos germes dentários, nas condições de experimentação. Os germes dentários, obtidos de animais mais jovens, foram mais resistentes que os obtidos dos animais mais velhos. O meio de cultura onde os discos dos cimentos ficaram depositados, apresentou melhores resultados, com relação aos demais experimentos, sugerindo que a liberação de substâncias tóxicas é constante na presença dos discos, e que as mesmas se dissipam quando são ausentes.

Berbert, Consolaro¹⁴ em 1994, avaliaram a influência de cimentos endodônticos na migração de polimorfonucleares neutrófilos, utilizando o teste “Skin Window”. Gotículas de cimentos recém manipuladas foram levadas a uma lamínula de vidro sobre escarificações feitas na pele de 10 indivíduos adultos jovens por um período de três horas. Decorrido este período, as lamínulas foram removidas, coradas em hematoxilina e eosina, montadas em lâminas de vidro e submetidas à análise em microscópio ótico. Este teste permitiu aos autores analisarem a citotoxicidade e a influência quimiotática dos materiais sobre os neutrófilos PMNs. O OZE, dentre todos os materiais, foi o que exerceu a maior quimiotaxia, embora tenha sido o material que melhor preservou as células estruturalmente. O Sealapex, apesar de ser o material que atraiu o menor número de neutrófilos PMNs, propiciou um grande aumento na degranulação celular, apresentando considerável citólise. O CRCS apresentou valores intermediários nas duas variáveis analisadas. Em ordem decrescente, quanto à agressão e migração celular, os cimentos puderam ser assim classificados: Sealapex, CRCS e OZE.

Beltes et al.¹³ em 1995, avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de três cimentos endodônticos que contêm hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS e Apexit) usando células L929 e BHK21/C13. Após 24 horas os cimentos foram cobertos com a suspensão celular, e a citotoxicidade determinada por uma técnica quantitativa, mostrando que todos os cimentos apresentaram-se citotóxicos. O Sealapex mostrou alta citotoxicidade. O CRCS foi menos citotóxico do que o Sealapex e mais tóxico do que o Apexit.

Economides et al.⁴¹ em 1995, avaliaram, *in vitro*, a biocompatibilidade de dois cimentos que contêm hidróxido de cálcio (Sealapex e CRCS), um à base de óxido de zinco e eugenol (Roth 811) e um do grupo das resinas epóxicas (AH26). Além disso, analisaram a influência dos componentes dos cimentos sobre as concentrações de cálcio e zinco de alguns órgãos. Um total de 75 ratos foram utilizados, divididos em cinco grupos de cinco animais cada, nos períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias. Os cimentos recém manipulados foram colocados em tubos de teflon e implantados no tecido subcutâneo dorsal. Após os períodos experimentais, os animais foram sacrificados e as peças obtidas preparadas para o exame histológico. Para análise do cálcio e zinco, 25 animais foram sacrificados uma semana após a implantação e o cérebro, fígado, rins e útero foram removidos e analisados por espectrofotometria. Os resultados demonstraram que o material mais irritante no período de 7 dias foi o AH26. Entretanto, a intensidade da inflamação decresceu após 21 dias. Já o Roth 811 e o Sealapex, apresentaram reação inflamatória moderada/severa, observada no período de 7 dias, persistindo até o final do experimento. A reação inflamatória moderada, vista em resposta ao CRCS aos 7 dias, decresceu gradualmente até os 21 dias. Embora o AH26 não contenha cálcio em sua composição, os valores da concentração de cálcio aumentaram em todos os órgãos examinados, quando comparados ao controle. Por outro lado, os órgãos dos animais onde se utilizou o CRCS e o Sealapex não apresentaram modificações nas concentrações de cálcio, em comparação ao grupo controle. Com relação ao zinco, altas concentrações foram observadas nas amostras teciduais obtidas dos animais do grupo do CRCS e Roth 811 (os dois cimentos contêm zinco na sua composição).

Mittal et al.¹⁰⁵ em 1995, avaliaram histologicamente a resposta tecidual frente a quatro cimentos obturadores de canais radiculares (OZE, Tubliseal, Sealapex e Endoflas FS). Utilizaram 15 ratos albinos adultos, nos quais foi injetado no tecido subcutâneo da região dorsal, 0,1ml de material espatulado. Os animais foram sacrificados 48 horas, 7, 14 dias, 1 e 3 meses após a injeção subcutânea. Os resultados histológicos revelaram que todos os cimentos causaram inflamação, a qual diminuiu com o decorrer do período, exceto no caso do OZE, que aumentou no período de 48 horas até 7 dias, tendendo a seguir, a uma diminuição. O Sealapex quando comparado com os outros cimentos utilizados, foi o material que revelou menor reação inflamatória, ocorrendo junto ao mesmo, uma reação inflamatória moderada somente até as 48 horas, a qual decresceu para suave nos demais períodos. O OZE, Tubliseal e o Endoflas FS foram severamente tóxicos nos períodos de 48 horas e 7 dias, tendo esta toxicidade diminuída gradualmente nos períodos mais prolongados. Nenhuma reação inflamatória foi observada aos 3 meses, em todos os cimentos testados.

Silva¹⁴⁹ em 1995, realizou avaliação histológica após obturação de canais radiculares em dentes de cães com vitalidade pulpar, empregando quatro diferentes cimentos que contêm hidróxido de cálcio. Os resultados, 180 dias após a obturação, demonstraram que o cimento Sealapex foi o que melhor permitiu a deposição de tecido mineralizado, apicalmente, sendo o único a apresentar selamento apical completo e com predomínio de infiltrado inflamatório ausente/suave. O CRCS apresentou predominantemente, selamento parcial e infiltrado inflamatório moderado, e o Apexit e Sealer 26 não apresentaram selamento. A avaliação histopatológica da reação provocada pelos cimentos após a injeção em tecido subcutâneo de camundongos isogênicos Balb/c, realizada nos períodos de 2, 4, 8 e 16 dias, mostrou, no período inicial, intenso infiltrado de leucócitos PMNs nos quatro cimentos testados. A partir do oitavo dia foi observada intensa redução dessas células, particularmente no Sealapex, que apresentou a maior diferenciação celular. Foi realizado, ainda, o estudo da migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos Balb/c, nos períodos de 6 a 24 horas, 5, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que nos períodos iniciais todos os cimentos induziram a um aumento de neutrófilos, quando comparados ao controle, tendo o Sealapex e CRCS apresentado

menores valores, atingindo valores semelhantes ao controle aos 5 dias. Finalmente, a análise do pH e condutividade dos cimentos nos períodos de zero, 1, 2, 4, 6 e 24 horas, 5, 15 e 30 dias, mostraram que o cimento Sealapex, durante todos os períodos experimentais, foi o que determinou maiores valores de pH, cálcio total e de cálcio iônico, seguido do CRCS, Apexit e Sealer 26.

Geurtsen, Leyhausen⁵³ em 1997, pensando em minimizar a incidência de efeitos colaterais e/ou sistêmicos, sugeriram que a biocompatibilidade de todos os materiais obturadores de canais radiculares, deveria ser investigada por vários testes *in vitro* e *in vivo* antes da sua aplicação clínica. Os testes *in vitro* incluem mutagenicidade, citotoxicidade e efeitos antibacterianos. Alguns trabalhos têm mostrado que cimentos à base de óxido de zinco e eugenol contêm paraformaldeído (N2 e Endomethasone), mostrando uma forte atividade antibacteriana, porém, são mutagênicos. Cimentos que contêm óxido de zinco e eugenol são classificados como sendo altamente/severamente citotóxicos, contrário àqueles que contêm hidróxido de cálcio (Sealapex e Apexit), que apresentam boa ou excelente citocompatibilidade. Estes resultados foram confirmados por numerosos trabalhos histológicos *in vivo*.

Leonardo et al.⁸⁸ em 1997, analisaram a biocompatibilidade de cimentos obturadores de canais radiculares. Foram utilizados 80 raízes de pré-molares de cães com vitalidade pulpar. Após o preparo biomecânico os dentes foram obturados alternadamente com guta-percha e os cimentos Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Apexit. Após 180 dias os cães foram sacrificados, as peças anatômicas removidas e submetidas à histotécnica. A análise microscópica evidenciou que o Sealapex permitiu um maior número de mineralizações apicais e ausência de infiltrado inflamatório apical. O selamento observado com o CRCS foi parcial e notou-se pequeno infiltrado inflamatório. Nenhum selamento apical com tecido mineralizado foi observado no uso do Apexit e Sealer 26, com infiltrado inflamatório severo no Apexit e leve no Sealer 26.

Leonardo⁹¹ em 1997, avaliou em cultura de macrófagos nos períodos de 1, 12, 24, 48 e 72 horas, a citotoxicidade de cinco cimentos endodônticos: Sealapex, Sealer 26,

Apexit, CRCS e Fill Canal. Foram avaliadas as alterações morfológicas e a liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quanto às alterações morfológicas, todos os cimentos foram tóxicos. Numa ordem decrescente da toxicidade, foram mais agressivos que o controle o Fill Canal, CRCS, Sealer 26, Apexit e Sealapex. Quanto à liberação de H_2O_2 a ordem crescente de toxicidade foi: Sealer 26, Fill Canal, Apexit, Sealapex e CRCS.

Rasquin¹³⁶ em 1997, fez avaliação histopatológica da reparação apical e periapical em dentes de cães portadores de lesão periapical crônica, experimentalmente induzida, após o tratamento de canais radiculares e obturação com os cimentos Sealapex, Sealer 26, Apexit e Fill Canal. Foram utilizados 80 canais radiculares portadores de necrose pulpar e reação periapical crônica. Decorridos 270 dias da obturação, os animais foram sacrificados. Após o processamento histológico os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Mallory. A análise microscópica dos cortes evidenciou ser o Sealapex biologicamente compatível, e a resposta tecidual em ordem crescente de severidade foi a seguinte: Sealer 26, Fill Canal e Apexit.

Silva et al.¹⁵⁰ em 1997, avaliaram a resposta inflamatória frente o Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26 em tecido subcutâneo e cavidade peritoneal de ratos Balb/c. A resposta inflamatória em tecido subcutâneo foi avaliada após 2, 4, 8 e 16 dias. Intensa neutrofilia foi vista em resposta a todos os cimentos durante os períodos iniciais. Houve diferenças entre eles relacionadas à presença de necrose e o número de células inflamatórias. Na fase intermediária marcada pela diferenciação celular do sistema fagocítico mononucleado em macrófagos, células epiteloídes e células gigantes multinucleadas foram observadas com o Sealapex. Esta resposta foi menos intensa com o CRCS e Apexit. Necrose do tecido foi observada somente na interface tecido cimento e somente durante o período inicial com o Sealapex, mas foi vista ao longo do experimento com todos os outros cimentos. Na cavidade peritoneal dos animais, foram injetados, soluções contendo os cimentos e cinco ratos de cada grupo foram sacrificados após 6, 24 horas e 5 e 15 dias. Durante os períodos iniciais (e 24 horas), houve uma migração intensiva de leucócitos PMNs para a cavidade peritoneal, em resposta para todos os cimentos, comparada ao controle. Essa migração foi mais intensa para o Sealer 26 e Apexit. Um aumento no número de células mononucleadas

foi observado depois de 6 e 24 horas e 5 dias para todos os cimentos, e nenhuma diferença foi observada em relação ao controle depois de 15 dias.

Geurtsen et al.⁵⁴ em 1998, avaliaram a citotoxicidade de quatro cimentos obturadores de canais radiculares (AH26, Apexit, Sealapex e N2) e guta-percha, em células 3T3 e cultura primária de fibroblastos do ligamento periodontal humano, pela determinação da proliferação destas células por meio de fluorcromo. Observaram que nenhuma alteração celular significativamente foi induzida pela guta-percha e Apexit, enquanto vários extratos de AH26 e Sealapex causaram moderada ou severa inibição do crescimento dessas células. Dano celular severo foi observado por todos os extratos de N2, com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais cimentos.

Tanomaru Filho et al.¹⁶³ em 1998, verificaram o efeito de dois cimentos endodônticos, o Sealapex (com de hidróxido de cálcio) e o Fill Canal (que contém óxido de zinco e eugenol), no reparo de dentes de cães, irrigando-se com hipoclorito de sódio a 5,25%. Os canais radiculares foram secos e um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio foi mantido por sete dias. Decorrido este período, os canais radiculares foram obturados com os dois cimentos, utilizando-se condensação lateral com guta-percha. Após 270 dias, os animais foram sacrificados, os procedimentos histológicos realizados, e os achados histológicos mostraram um melhor reparo para os dentes obturados com o Sealapex.

Huang et al.⁶⁴ em 2001, avaliaram a genotoxicidade de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol (Canals, Canals-N e Tubliseal), com hidróxido de cálcio (Sealapex) e resina epóxica (Topseal, AH26 e AH Plus). Utilizaram cultura de células de carcinoma oral, e o teste utilizado para leitura foi eletroferose. Verificaram o maior nível de dano no DNA, induzido pelos cimentos resinosos, seguidos pelos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (que nem sempre causaram aumento na genotoxicidade), e nenhum efeito ocorreu com cimentos com hidróxido de cálcio. Os autores encerram, questionando sobre a escolha do cimento ideal, onde as propriedades físicas e os efeitos biológicos devem ser bem analisados.

Com o surgimento de inúmeros cimentos endodônticos e considerando a literatura sobre a agressão tecidual provocada pelo extravasamento de cimentos obturadores de canais radiculares para o periápice, propôs-se avaliar, por meio de teste edemogênico, a biocompatibilidade tecidual dos cimentos Endomethasone, Sealapex, Sealer Plus e Sealer 26. O teste edemogênico quantifica o edema frente ao material analisado, verificando entre os cimentos experimentados aquele que apresenta menor resposta tecidual, uma vez que a quantificação do edema, um dos primeiros eventos da inflamação, permite uma comparação da biocompatibilidade tecidual entre eles. Utilizaram 48 ratos machos (Wistar), distribuídos em grupos de seis para cada tempo pós-operatório para cada um dos cimentos que, após a espatulação foram imediatamente injetados no tecido conjuntivo subcutâneo da região dorsal dos animais. Cada cimento foi avaliado em tempos pós-operatórios de três a seis horas. Baseando-se nos resultados obtidos com auxílio de um espectrofotômetro, pode-se concluir que houve maior quantidade de edema no tempo pós-operatório de três horas em todos os cimentos. O Endomethasone e o Sealer Plus apresentaram reação inflamatória inicial acentuada, mas que diminuiu com o tempo, já o Sealapex e o Sealer 26 foram os mais biocompatíveis com os tecidos por apresentarem menor índice de exsudato inflamatório, quando comparados com o Endomethasone e Sealer Plus (AU) (Canova et al.³², 2002).

De acordo com Huang et al.⁶³ em 2002, os resultados mostraram que os componentes dos cimentos compostos resinosos, cimentos compostos à base de óxido de zinco e eugenol, e cimento à base de hidróxido de cálcio foram citotóxicos para células primárias do ligamento periodontal, cultura e células V79. O cimento com hidróxido de cálcio (Sealapex) foi o que apresentou a menor citotoxicidade entre os cimentos experimentados em ambas culturas. A citotoxicidade apresentou-se em uma ordem decrescente de N2, Endomethasone, AH26, AH Plus, Canals e Sealapex. Assim, os autores concluírem que, inicialmente, o uso de cimentos com hidróxido de cálcio como material obturador de canais radiculares pode resultar em uma resposta mais favorável aos tecidos periradiculares, embora a sensibilidade citotóxica dependa dos materiais a serem experimentados e do sistema celular de cultura usado, devendo passar por outros estágios ou níveis de experimentação. O objetivo deste estudo foi determinar a citotoxicidade de três

diferentes cimentos endodônticos em células do ligamento periodontal humano e um cimento em linhagem de células de Hamster V79. Foram utilizadas sete amostras de dois cimentos compostos resinosos, AH26 e AH Plus, três cimentos compostos de óxido de zinco e eugenol (Canals, Endomethasone e N2) e um cimento composto com hidróxido de cálcio, o Sealapex. Foram colocados em meio de cultura por 1, 2, 3 e 7 dias. A citotoxicidade foi avaliada utilizando um meio através da redução do Brometo de Tetrazólio nas células humanas primárias do ligamento periodontal, e nas células do V79 derivado dos Hamster chineses.

O objetivo deste estudo foi comparar a citotoxicidade de cimentos obturadores de canal radicular à base de fosfato de cálcio (selador de raiz Apatita (ARS) Tipo I, II, III) com outros quatro seladores endodônticos (Pulp Canal Sealer EWT, AH Plus, Sealapex, Ketac Endo). Os extratos dos cimentos foram obtidos em meios de cultura após a mistura dos mesmos durante os sete seguintes períodos: 1h (0-1h), 8h(1h-8h), 24h(8h-24h), 48h (24h-48h), 1 semana (48h- 1 semana), 2 semanas (1-2 semanas), 4 semanas (2-4 semanas). Fibroblastos L929 de rato foram expostos à cada extrato de cimento e os efeitos citotóxicos foram avaliados usando o método MTT e a análise neutra vermelha (NR). Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do teste Kruskal-Wallis, Friedman's 2-way ANOVA. Os tipos ARS I, II, III mostraram citotoxicidade muito baixa em todos os períodos de observação em ambas as análises. Não houve diferença significativa entre a citotoxicidade dos tipos ARS I, II, III em cada intervalo de tempo ($p>0,05$). Os tipos AH Plus e Ketac Endo induziram uma citotoxicidade severa inicial, mas uma baixa citotoxicidade após 8h (AH Plus) e após 24h (Ketac Endo). O cimento Pulp Canal Sealer EWT e o Sealapex mostraram uma citotoxicidade longa que durou até 4 semanas. Na maioria dos casos, os efeitos citotóxicos de cada amostra dos cimentos mostraram padrões semelhantes entre a análise MTT e análise NR. Estes achados indicam que o Tipo ARS I, II, III são materiais muito compatíveis porém precisam de mais avaliação e desenvolvimento (Kin et al.⁷⁶, 2003).

AH Plus

Almeida² em 1997, avaliou histologicamente a resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, após biopulpectomia e obturação dos canais radiculares com os cimentos Ketac Endo, Fill Canal e AH Plus. O cimento Ketac Endo foi avaliado após 270 dias tendo como controle o Fill Canal; o AH Plus foi avaliado após 90 dias tendo também como controle o Fill Canal como controle. O Ketac Endo não apresentou selamento apical total em nenhum dos casos, e nos casos de selamento parcial, o tecido conjuntivo intersticial contido entre as paredes do selamento neoformado, apresentava infiltrado inflamatório mononuclear suave/moderado, poucas fibras colágenas, edema e poucos cementoblastos junto à parede do selamento. Em contato com o cimento obturador, havia necrose superficial e congestão vascular. Nos casos de ausência de selamento, o tecido intersticial apresentava também áreas de necrose em contato com o material obturador, e moderado/severo infiltrado inflamatório mononuclear que se estendia até o periápice. No grupo do Fill Canal, após 270 dias, nos casos de selamento apical, o tecido intersticial invaginado para o interior do canal radicular apresentava poucos fibroblastos e fibras colágenas e quando em contato com o material obturador, havia necrose e infiltrado inflamatório moderado, constituído predominantemente por células mononucleares. A região periapical apresentava resposta inflamatória de intensidade moderada/severa, constituída por células mononucleares, edema, poucos fibroblastos e fibras colágenas. No AH Plus após 90 dias, nos casos de selamento parcial, o tecido intersticial apresentava numerosos fibroblastos, intensa presença de fibras colágenas e ausência de células inflamatórias, exceto raros macrófagos, e as ramificações do delta apical apresentavam tecido conjuntivo íntegro. O Fill Canal após 90 dias na região periapical evidenciava resposta inflamatória de intensidade moderada/severa, edema, poucos fibroblastos e fibras colágenas dissociadas.

Leonardo et al.⁸⁶ em 1999, avaliaram a liberação de formaldeído por quatro cimentos endodônticos, pois, a literatura mostra que alguns cimentos como o Endomethasone e o N2, que contêm formaldeído, podem causar necrose tecidual e inflamação, embora lentamente ocorra a reparação. Outros cimentos como o AH26, não contêm formaldeído na fórmula, mas através de uma reação química após misturado

(envolvendo dois componentes: resina bisfenol A e hexametilenotetramina), ocorre a liberação de formaldeído dos cimentos. Neste trabalho foi utilizado um espectrofotômetro para verificar a liberação de formaldeídos dos cimentos Endomethasone, AH26, AH Plus e Top Seal. Os autores observaram que o AH Plus e o Top Seal liberaram um mínimo de formaldeído, estatisticamente insignificante quando comparado aos demais.

Leonardo et al.⁸⁷ em 1999, avaliaram a resposta tecidual de um cimento endodôntico à base de resina epóxica, o AH Plus, o qual foi comparado ao Fill Canal (que contém óxido de zinco e eugenol). Trinta e quatro pré-molares de cães foram usados. Depois da instrumentação, os canais radiculares foram obturados com guta-percha e com os cimentos citados, utilizando a técnica da condensação lateral. Após todos os procedimentos histológicos, não observaram células inflamatórias, nem áreas de necrose associadas ao cimento AH Plus. Formação de tecido duro apicalmente ao material foi observado 3m aquém em 14 espécimes. Já o Fill Canal apresentou uma resposta inflamatória de intensidade moderada na região periapical, principalmente adjacente ao material.

Koulaouzidou et al.⁸¹ em 1998, avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de três cimentos endodônticos à base de resina (AH26, AH Plus e Topseal). O cimento endodôntico ideal deveria ter, entre outras características, uma boa capacidade seladora e biocompatibilidade. Ambas características importantes para o sucesso clínico do tratamento endodôntico. Hoje, temos vários tipos de cimentos endodônticos, os quais estão divididos em: não contendo eugenol, contendo eugenol e os que contêm hidróxido de cálcio. Dentro da categoria dos cimentos que não contêm eugenol, temos os cimentos à base de resina, como o AH26. A Dentsply/DeTrey desenvolveu um novo cimento, o AH Plus. Também a Dentsply/Maillefer introduziu o Topseal, que contém a mesma formulação do AH Plus. Os testes foram realizados *in vitro* com células L929 (fibroblastos de camundongos). O AH26 mostrou-se severamente citotóxico quando comparado ao AH Plus e Topseal, os quais, similarmente, mostraram uma baixa toxicidade.

O objetivo de estudo de Tai et al.¹⁵⁸ em 2001, foi determinar a citocompatibilidade de três diferentes extratos de cimentos de canais radiculares e para comparar a

citotoxicidade responsável destes materiais em 2 tipos diferentes de fibroblastos primários de humanos oral (derivados da gengiva e da mucosa bucal) e uma célula linha permanente de Hamster (V79 células). A citotoxicidade foi avaliada usando um método ou meio MTT ou seja, redução de brometo de tetrazólio. Os resultados mostraram que os cimentos obturadores de canais radiculares, AH Plus, Canals e N2 foram citotóxicos para as culturas primárias de fibroblastos oral humano e para as células V79. Foi achado que N2 foi o mais citotóxico dos cimentos entre aqueles que foram experimentados em todas as culturas. A citotoxicidade decresceu ou diminuiu, em uma ordem de N2>AH Plus>Canals. A sensibilidade da citotoxicidade depende dos materiais experimentados e do sistema de cultura de células utilizados.

Schwarze et al.¹⁴⁴ em 2002, determinaram a citotoxicidade de diversos tipos de cimentos de canal radicular in vitro sobre o período de 1 ano, usando um modelo novo de teste. Raízes de dentes humanos foram extraídas e os canais preenchidos com o N2, Apexit, Roekoseal, AH Plus, Ketac Endo, Endomethasone e cones de guta-percha. Além disso, as raízes foram preenchidas com guta-percha/N2 lateralmente condensada. Canais preenchidos só com um cone de guta-percha serviram de controle. Todos os espécimes foram extraídos consecutivamente e conservados em água destilada por um período de 1 ano. Os extratos foram investigados para a citotoxicidade por fibroblastos 3T3 e fibroblastos do ligamento periodontal humano. Os resultados foram analisados estatisticamente com teste de Dunnett's ($p>0,05$). Os efeitos citotóxicos pronunciados foram causados somente por extratos de N2 em ambas as culturas de células ($p>0,05$). Além disso, as alterações citotóxicas estatisticamente significantes foram induzidas pelos espécimes de Endomethasone de 10 semanas ($p>0,05$). Todos os outros materiais investigados não alteraram significativamente o metabolismo das células.

Após do anterior trabalho, Schwarze et al.¹⁴⁵ também em 2002, avaliaram a biocompatibilidade celular de cinco cimentos endodônticos nas primeiras 24 horas após misturá-los. Os espécimes do N2, Endomethasone, Apexit, AH Plus e do Ketac Endo foram colocados com as células do meio de cultura 0, 1, 5 e 24. As amostras foram testadas para a citotoxicidade com células 3T3 e fibroblastos do ligamento periodontal humano usando um

ensaio de MTT. Os dados foram analisados por meio do testes de Dunnett's ($p>0,05$). Os extratos do N2 inibiram completamente o metabolismo da célula ($p>0,05$). Os efeitos similares foram provocados pelas primeiras três amostras de Endomethasone, mas o extrato das 24 horas, significativamente, irritou mais células ($p>0,05$). Uma inibição significativa da atividade mitocondrial foi induzida pelo primeiro (3T3) ou primeira ou segunda amostra (fibroblastos do ligamento periodontal) do AH Plus ($p>0,05$). As subseqüentes amostras destes cimentos endodônticos e todos os extratos de Apexit não revelaram nenhum potencial de citotoxicidade.

Polímero de Mamona

Em 1984, o Prof. Dr. Gilberto Chierice do grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Universidade de São Paulo, Campus São Carlos, desenvolveu um novo polioli derivado de polímero de mamona fornecendo algumas informações sobre o material.

“A mamona (*Ricinus communis*, da classe das Dicotiledóneas, Ordem Genareaceas e família Euforbaceas) constitui um vegetal típico de clima tropical e, o Brasil, devido às suas características climáticas e por sua grande extensão territorial, apresenta-se como um dos grandes produtores mundiais desse produto.

A mamona possui um grande potencial óleoquímico, podendo garantir o fornecimento de polímeros e pré-polímeros a partir de ácidos graxos em larga escala. O óleo de mamona, também conhecido como óleo de rícino, é um produto de ordem vegetal contendo, em sua composição, de 81 a 96% de triglicérido do ácido ricinoléico, podendo ser considerado um polioli natural por conter 3 radicais hidroxilas passíveis de serem utilizados na síntese de poliuretanas.

Estruturalmente, o óleo de mamona é um poliéster, possuindo 3 moléculas de ácido 12-hidroxi-oléico (ou ricinoléico), sendo que cada uma delas apresenta um grupo hidroxila no carbono 12 (USP São Carlos, 1994).

Os polióis vegetais à base do ácido ricinoléico são estáveis em função da maior estabilidade química das ligações uretanas, que apresentam maior resistência à reação hidrolítica. A química envolvida na síntese da poliuretana está baseada nas reações com um grupo isocianato. A reação de pré-polimerização para a formação da poliuretana é feita entre um diisocianato e um polioli, de maneira a deixar grupos isocianatos livres no produto final. O pré-polímero é um líquido viscoso com menos reatividade do que o diisocianato de partida. A reação de polimerização final com o pré-polímero para a formação da poliuretana pode ser feita com undiol, diamina ou ainda um polioli.

Os polióis utilizados na síntese de poliuretanas são moléculas de alto peso molecular, contendo dois ou mais radicais hidroxilas, apresentando-se, geralmente, na forma de poliéster e poliéter. A poliuretana é derivada do poliálcool poliéster, obtido a partir de ácido graxo vegetal e difenilmetanodiisocianato.

A poliuretana derivada do óleo de mamona apresenta uma fórmula molecular que tem mostrado certa compatibilidade com os tecidos vivos, apresentando: aspectos favoráveis de processamento; flexibilidade de formulação; versatilidade de temperatura de cura e controle de pico exotérmico na transição líquido-gel; excelentes propriedades estruturais; ausência de emissão de vapores tóxicos; bom poder de adesão; não libera radicais tóxicos quando implantada e baixo custo”.

“Nos últimos anos, a pesquisa com os biopolímeros (polimetilmetacrilato, politetrafluoroetileno (Teflon), polietileno, poliéster e silicones (ganhou grande impulso, com diversas aplicações nas áreas de implantes odontológicos, cardiovasculares e outras. Com a crescente conscientização de preservação e aproveitamento controlado de produtos ecológicos, com conseqüente diminuição da toxicidade dos produtos obtidos a partir dessa biomassa, a síntese de resinas poliuretanas tem conquistado grande espaço de pesquisa. A utilização do polímero de polimetilmetacrilato apresenta alguns inconvenientes, como o fato de desprender calor, causando necrose dos tecidos vizinhos, emitir gases tóxicos e, ainda, provocar fenômenos trombo-embólicos”. (Ignácio⁶⁷, 1995; Pascon¹²³, 1999).

Um modelo experimental, com a finalidade de verificar a neoformação óssea e integração do cimento derivado da poliuretana de mamona no preenchimento de falha óssea produzida, foi desenvolvido por Ignácio⁶⁷ (1995). Foram utilizados coelhos machos, com idades variando entre 8-10 semanas de vida, pesando aproximadamente 2 kg. Devido às características anatômicas dos ossos do antebraço do animal foram produzidas falhas ósteoperiostais de 2,0 cm bilateralmente nos raios (correspondendo aproximadamente 30% do comprimento total do osso), que foram preenchidas com cimento derivado do polímero de mamona. Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com os períodos experimentais de 2, 4, 8, e 16 semanas, fazendo-se o estudo

radiológico, macroscópico e histológico em cada tempo de observação. Um grupo controle composto por 6 animais, onde a falha osteoperiostal de 2,0 cm bilateralmente era deixada sem preenchimento, também foi estudado. Análise dos resultados demonstrou que, apesar da membrana inter-óssea potente e de um forte sistema ligamentar que unia os dois ossos, todos os seguimentos do grupo controle tiveram perda do alinhamento do membro (deslizamentos epifisários e fraturas), ao contrário dos antebraços, onde a falha óssea produzida foi preenchida com o cimento derivado do polímero de mamona, que suportaram bem as forças mecânicas exercidas pela marcha normal. Radiograficamente, nos animais em que foi implantado o cimento derivado do polímero de mamona houve, na quase totalidade dos casos, união sólida das interfaces cimento/osso proximal e distal. O osso neo-formado, a partir das extremidades ósseas proximal e distal, praticamente uniu-se na região central do enxerto nos períodos finais do estudo, visualizando-se, em alguns casos, a formação de uma cortical óssea delgada e esboço de um canal medular. Histologicamente, não foi verificada a presença de células gigante de corpo estranho que pudesse indicar qualquer grau de toxicidade do material. O processo de neo-formação óssea foi gradual, progressivo e organizado a partir das interfaces cimento/osso proximal e distal em direção à região central do material, iniciando-se por um processo inflamatório decorrente da agressão produzida pelo ato cirúrgico, processo este que diminuiu paulatinamente. A formação fibroblástica foi substituída por lamelas ósseas ao longo do tempo, que praticamente uniram-se na região central do cimento no grupo de avaliação mais longa (16 semanas). Foi, também, observada a formação de uma cortical fina e um neo-periósteo cobrindo o tecido ósseo neo-formado.

Em 1997, Roslindo et al.¹⁴⁰ estudaram experimentalmente germes dentários de primeiros molares inferiores, de fetos de camundongos com 17 dias, cultivados *in vitro*, durante 6 dias, juntamente com resina poliuretana vegetal. Os germes dentários foram incubados em meio de cultura em estufa com atmosfera umidificada, com 5% de CO₂ a 37°C. A resina poliuretana vegetal elaborada a partir do óleo de mamona foi testada isoladamente ou acrescida de 50% de carbonato de cálcio. A resina poliuretana vegetal, avaliada isoladamente ou acrescida de carbonato de cálcio, mostrou-se compatível com o

desenvolvimento dos germes dentários quando cultivados *in vitro*, sugerindo a não liberação de substâncias tóxicas para o meio de cultura.

Kharmandayan⁷⁴ em 1997 estudou por meio de implantes em osso de coelho, a interface entre o osso e o pino de poliuretana, durante o processo de reparação do tecido nos tempos de observação de 1, 30, 60, 120, 180 e 360 dias de pós-operatório, utilizando microscopia de luz e eletrônica de varredura. Os resultados revelaram que no primeiro dia pós-operatório, a parede óssea do canal de implante do pino estava revestida por smear layer, conseqüente à ação da broca. Os grupos de 30, 60, 120 dias de pós-operatório, mostraram a formação de tecido colágeno denso envolvendo a superfície do pino. Pequenas irregularidades de superfície dos implantes foram notadas nestes grupos, revelando a adesão do colágeno à superfície da resina, o que provocou uma reparação na interface osso/pino. As trabéculas ósseas adjacentes revelaram uma disposição irregular tanto em cortes histológicos, como nos aspectos tridimensionais em imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura. A orientação das fibras colágenas era notada nitidamente envolvendo a superfície do pino. Nos grupos de 180 e 360 dias de pós-operatório, houve uma formação de fibras colágenas de disposição ordenada. Os aspectos histológicos revelaram a presença de um tecido conjuntivo denso constituindo a interface osso/pino. O implante de poliuretana foi acompanhado de uma neo-formação óssea bem evidente, na porção próxima à superfície que se estendeu até a profundidade do canal. Além disso, os dados obtidos revelaram diferenças apenas de aspectos estruturais decorrentes da reparação do tecido, nas fases examinadas, mais intensas no grupo de 360 dias de pós-operatório e com pinos com carbonato de cálcio.

Em 1998, Frascino⁴⁷ desenvolveu um modelo experimental com a finalidade de avaliar a viabilidade da utilização de implante de resina poliuretana vegetal na reparação de falhas ósseas na calota craniana de coelhos, analisando os fenômenos de osteocondução, osteogênese, osteoindução, incorporação e osteopromoção. Foram produzidas falhas ósseas com área média de 1,5 cm² de espessura total, desperiostizadas bilateralmente, que estavam afastadas cerca de 3 mm da linha médio craniana. Oito animais formaram o grupo controle, onde as falhas foram deixadas sem preenchimento e

18 tiveram as falhas ósseas preenchidas com implante de resina poliuretana, por tempos de observação de 2, 6, 12, 18 e 24 semanas. As avaliações macroscópicas, radiológicas e histológicas não mostraram reparação dos defeitos por neo-formação óssea em nenhum dos animais do grupo controle. As falhas ósseas eram ocupadas por tecido cicatricial, com formação de uma membrana fibrosa no local. Os animais que receberam a poliuretana apresentaram, a partir de 6 semanas, neo-formação óssea, reparando o defeito em suas porções periféricas. A partir desse período, observou-se uma fragmentação irregular e progressiva da resina implantada, acompanhada de deslocamento de seus fragmentos nos casos mais tardios, permitindo a ocorrência de osteogênese e osteocondução, com osso neo-formado, reparando satisfatoriamente as falhas produzidas. Este processo foi, também, favorecido pela ocorrência de osteopromoção, com implantes exercendo um “efeito membrana” nos leitos de implantação. Em apenas um animal, com 24 semanas, não foram observadas neo-formação óssea e fragmentação de resina. Não foi observada atividade fagocitária com os implantes, não sendo incorporados até 24 semanas de observação, embora se tenha considerado a possibilidade da ocorrência de degradação metabólica dos implantes, por mecanismo ainda desconhecido. Não foram observados fenômenos tóxicos ou reacionais, secundários à presença dos implantes. Não foram observadas propriedades osteoindutivas nos implantes.

O primeiro e único trabalho de pesquisa, com o polímero de manona, no campo odontológico, encontrado na literatura, foi desenvolvido por Costa et al.³⁶ (1997) que testaram a biocompatibilidade da poliuretana de mamona colocada em tubos de polietileno, que foram implantados no dorso de ratos por períodos de observação de 7, 15, 30, e 60 dias. O material foi comparado com o óxido de zinco e eugenol (OZE). Aos 7 e 15 dias a poliuretana promoveu moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleadas, novos vasos sanguíneos e degradação de colágeno. Esses eventos histopatológicos foram menos relevantes para o OZE. Com o decorrer dos períodos, foi notada regressão dos eventos inflamatórios e reparação junto à abertura dos tubos. Aos 30 e 60 dias, um tecido fibroso denso envolvia o tubo de polietileno, sendo que para ambos materiais, o tecido conjuntivo adjacente apresentava características histológicas de

normalidade. O OZE foi menos irritante que a poliuretana quando implantado, porém os materiais apresentaram biocompatibilidade aceitável.

Em 1998, Fuentefria et al.⁴⁸ desenvolveram um modelo experimental com o objetivo de avaliar, por meio de microscopia óptica, as reações teciduais frente ao implante intra-ósseo do polímero de mamona em tibia de ratos. Trabalhou-se com ratos *Novergicus wistar*, com aproximadamente um ano de idade e pesando 340g, em média. Os animais foram divididos em três grupos, denominados de A, B e C, sendo cada grupo subdividido em dois subgrupos, teste e controle, de acordo com o tempo de observação: A1 e A2-21 dias; B1 e B2-14 dias e C1 e C2-7dias. Todas as peças operatórias foram radiografadas e, então, processadas pela técnica histológica corrente, sendo os cortes corados por hematoxilina e eosina. Os achados histológicos demonstraram que o uso da poliuretana vegetal, como material de implante, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos respectivos controles. A ausência de abscessos e reação de corpo estranho possibilitam considerar estes fatores como indicativos de biocompatibilidade do material. O início de osteogênese foi mais precoce nas amostras tratadas com poliuretana vegetal, com avaliação estatística positiva, em relação às respectivas amostras-controle, no subgrupo C2. Os resultados obtidos recomendam a continuação das pesquisas com esse material.

Pascon¹²³ em 1999, comparou a biocompatibilidade do polímero de mamona [Poliol (P)] com os cimentos AH26 (A), Dentinol (D), Kerr Sealer (K) e Sealapex (S), utilizando os testes iniciais de citotoxicidade, os secundários de implante em subcutâneo e implante intra-ósseo em cobaias, recomendados pelos documentos da FDI e ADA/ANSI. O método in vitro foi o de liberação de cromo radioativo em cultura de células L929. Os materiais foram testados por 4 e 24 hrs, recentemente preparados (frescos), 24 e 60 hrs após a presa. As células, sem contato com o material, serviram como controle da liberação espontânea. A análise estatística dos resultados mostrou diferenças significantes entre os materiais, os quais foram classificados, por ordem decrescente de toxicidade, em: 4 hrs, fresco: K, A, D, S, P; 24 e 60 hrs, presa: K, S, P, A, D; 24 hrs, fresco: A, D, S, K, P; 24 hrs, presa: K, D, S, P, A e 60 hrs, presa: K, S, P, A, D. Para o implante subcutâneo

foram utilizadas 45 cobaias, as quais receberam quatro implantes dorsais com o mesmo material. A parede externa do tubo serviu como controle. Para o implante intra-ósseo, 84 cobaias receberam 1 implante de cada lado da sínfise da mandíbula. Corpos vazios e a parede externa do corpo serviram como controle. Após 30, 60 e 90 dias, os animais foram sacrificados e os espécimes processados para exame histológico de rotina. Os resultados mostraram que todos os materiais, com exceção do Poliol, apresentaram reação inflamatória que variava de moderada a severa em todos os tempos de observação, nos dois testes utilizados. Esses resultados permitiram concluir que, de acordo com os critérios da FDI e ADA/ANSI, o Poliol foi considerado um material biocompatível, apresentando condições biológicas para sua utilização como material de obturação de canal.

Em 1999, Tavano et al.¹⁶⁴ avaliaram a densidade radiográfica (níveis de cinza da imagem radiográfica), em 3 grupos de coelhos por período (15, 30, 90 e 120 dias), realizando-se defeitos nas tíbias dos mesmos, nos quais foi implantado polímero derivado de mamona em uma tíbia; e preservando a outra apenas com o defeito, em cada animal, como controle. Os animais foram sacrificados em diferentes períodos e foram obtidas imagens radiográficas digitais das peças por meio da placa de imagem sensibilizada por um aparelho de raios X convencional que foi lida pelo escaner a laser do sistema Digora (Soredex - Finland) utilizando um computador IBM-PC compatível. Avaliou-se por meio deste programa de imagem (Digora for Windows 5.1) a densidade radiográfica das áreas teste e controle em diferentes períodos e comparou-se com a radiopacidade subjetiva obtida das radiografias convencionais, concluindo que a imagem digital oferece boas condições de visualização para realização da interpretação radiográfica. A análise da densidade radiográfica digital demonstrou a evolução e o retardo do processo de reparo, tal como ocorre na avaliação subjetiva da imagem radiográfica, mas permite ao profissional a obtenção de dados numéricos para analisar objetivamente a evolução do reparo ósseo.

Puricelli et al.¹³³ em 1999, realizaram um estudo onde analisaram o comportamento do polímero poliuretano da mamona implantado em leito subperióstico em ângulos mandibulares de ratos. Vinte *Rattus norvegicus* (var. *Albinus rodentia*

mammalia, cepa Wistar) foram divididos em quatro grupos de cinco animais. O polímero poliuretano da mamona, com adição de carbonato de cálcio, foi implantado no bordo inferior da mandíbula dos mesmos. Em cada grupo, um animal correspondeu ao controle, tendo sido submetido à cirurgia sem a colocação do implante. Os animais foram sacrificados após 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Ao exame histológico, em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE), observou-se a estabilidade do implante, a ausência significativa de reação inflamatória, a formação de cápsula fibrosa circunjacente ao implante e neoformação óssea. Segundo as condições experimentais, concluiu-se que o polímero poliuretano de mamona, implantado em leito subperióstico, não desencadeou reação inflamatória tardia significativa, tendo levado ao desenvolvimento de cápsula fibrosa circunscrita, com evolução para neoformação óssea. Sinais de rejeição, exposição ou expulsão do implante não foram observados.

Teixeira et al.¹⁶⁷ em 1999, estudaram a neoformação óssea basal da mandíbula de 40 ratos, após preparo de defeito ósseo com fresa cilindro-cônica e preenchimento ósseo de 20 ratos do grupo experimental com poliuretano vegetal sem CaCO₃. Os demais 20 ratos, representando o grupo controle, não receberam nenhum tratamento. Decorridos 15, 25, 40 e 60 dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados e suas mandíbulas removidas e coradas com hematoxilina e eosina para o estudo morfológico sob microscopia óptica comum. Os resultados demonstram grande aceitação orgânica à resina, não ocorrendo formação de cápsula, tampouco migração local de células inflamatórias.

Garcia-Júnior⁵⁰ em 2000, avaliaram o processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos realizados na parede anterior do seio maxilar, após osteotomia e colocação de implantes de polietileno poroso de alta densidade - Medpor, poliuretano de mamona (*Ricinus communis*) e matriz óssea desmineralizada bovina. Foram empregados 8 macacos pregos (*Cebus apella*). As análises foram feitas após 145 dias de implantação por meio de avaliações histológicas e histométricas utilizando método de microscopia óptica computadorizada - Imagelab 98. Os resultados mostraram que o reparo ósseo se estabeleceu em 77,24 por cento da superfície de contato com a matriz óssea bovina, 41,31

por cento com o Medpor e 28,24 por cento do polímero de mamona. Houve prevalência de neoformação conjuntiva (58,5 por cento) no grupo sem implantações. Como conclusões finais, pode-se afirmar, que o melhor comportamento histomorfológico foi da matriz óssea bovina, seguida do polietileno poroso de alta densidade - Medpor e da poliuretana de mamona (*Ricinus communis*), a qual respondeu com intensa fibrose e moderado infiltrado inflamatório crônico tardio.

Calixto et al.²⁹ em 2001, realizaram um trabalho onde os objetivos foram: 1) testar a biocompatibilidade de uma resina natural, derivada do óleo de mamona, implantada na cavidade de extração dental de ratos, e 2) estudar a possível interferência do material na cronologia do reparo alveolar. O material (AUG-EX, Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda., Araraquara - SP) foi implantado no alvéolo imediatamente após a extração do incisivo superior direito e os ratos foram sacrificados de 1 a 6 semanas após a extração ou extração + implante. As hemimaxilas foram descalcificadas e processadas para inclusão em parafina e obtenção de cortes semi-seriados, corados com hematoxilina-eosina. Os flocos da resina, de forma irregular e tamanho variável, localizaram-se entre os terços alveolares médio e cervical, inicialmente circundados por tecido de granulação e a seguir por quantidade progressivamente maior de tecido ósseo, no geral, com a presença de um tecido conjuntivo interposto, mas em algumas áreas estabelecendo aparente osseointegração direta. Não houve persistência da reação inflamatória, mas observou-se pequena quantidade de células gigantes aderidas à superfície do material, em todos os períodos. A análise histométrica (contagem diferencial de ponto) do terço apical mostrou um atraso de 13 por cento a 20 por cento no reparo alveolar dos ratos implantados, com menor neoformação óssea associada a maiores volumes percentuais de tecido conjuntivo e de remanescentes do coágulo sangüíneo.

Cavaliere et al.³⁵ em 2001, realizaram um estudo comparativo das respostas teciduais após a implantação de polímero de mamona, cimento ósseo e resina acrílica termicamente ativada, em defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados nas tíbias de coelhos, mediante análises microscópicas por meio da microscopia de luz. Foram utilizados nove coelhos adultos com peso médio de aproximadamente quatro quilos que foram divididos

em quatro grupos: Polímero de Mamona (PM), Cimento ósseo (CO), Resina Acrílica termicamente Ativada (RATA) e Controle. Inicialmente, realizou-se a confecção de dois defeitos ósseos em cada tíbia. No lado direito, um defeito foi preenchido com polímero de mamona (grupo PM) e o outro com cimento ósseo (grupo CO). No lado esquerdo, um defeito foi preenchido com resina acrílica termicamente ativada (grupo RATA) e o outro foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo (grupo Controle). Decorridos 30 dias, 60 e 90 dias, três coelhos de cada grupo foram sacrificados. As peças contendo os defeitos ósseos foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10 por cento, processadas e submetidas às análises macroscópica e microscópica através da microscopia de luz. O polímero de mamona, a resina acrílica termicamente ativada e o cimento ósseo foram bem tolerados pelos tecidos hospedeiros.

Em 2002, Bonini et al.²⁴ estudaram a poliuretana derivada do óleo da mamona para substituir o tecido ósseo, considerando-se que ela tem demonstrado ser um material biocompatível e barato. O objetivo do presente trabalho foi estudar o tipo, intensidade e duração da resposta inflamatória induzida por esta poliuretana. A suspensão do material na forma calcificada foi testada em camundongos isogênicos C57/BL/6. Por meio de microscopia de luz observou-se a migração de leucócitos na cavidade peritoneal da suspensão, a qual revelou, inicialmente, o crescimento e predomínio do número de neutrófilos, e subsequente ao decréscimo destes, o predomínio das mononucleadas. E, embora no pulmão e no tecido subcutâneo, após as injeções endovenosa e subcutânea, a cinética de leucócitos tenha sido semelhante a essa, no último, observou-se a diferenciação morfológica de macrófagos e o desenvolvimento de granuloma do tipo corpo estranho. Portanto, concluímos que a poliuretana derivada do óleo da mamona apresentou um comportamento favorável à biocompatibilidade.

Endo-Rez

Kardon et al.⁷¹ em 2003, compararam o selamento apical proporcionado pelos cimentos Endo-Rez e AH Plus, ambos utilizados na técnica de cone único de guta-percha. Foram utilizados 20 dentes por grupo, que permaneceram por sete dias após a obturação em temperatura ambiente e umidade 100%. Foi utilizada a metodologia de transporte de fluídos para acessar a capacidade seladora. Os resultados demonstraram maiores níveis de infiltração para o cimento Endo-Rez.

Zmener et al.¹⁸⁵ em 2004, avaliaram a biocompatibilidade de um selador de canais radiculares à base de metacrilato (Endo-Rez). Foram implantados, no tecido conjuntivo subcutâneo do dorso de 24 ratos wistar brancas, tubos de silicone contendo o cimento recentemente preparado, de acordo com as recomendações do fabricante, e barras de silicone do mesmo tamanho dos tubos, utilizadas como controle. Após os períodos experimentais de 10, 30, 90 e 120 dias, os animais foram mortos e as amostras preparadas com métodos de rotina histológica para sua avaliação por meio do método de análise da elemental electron-microprobe (EMP). Os resultados mostraram, aos 10 dias, severa reação granulomatosa com numerosos linfócitos polimorfonucleados, linfócitos e plasmócitos ocasionais, assim como macrófagos e células gigantes de corpo estranho. Aos 30 dias, os espécimes apresentavam, nas áreas de contato com o Endo-Rez, severa reação tissular persistente, macrófagos e células gigantes com partículas de material estranho no seu citoplasma. Aos 90 dias, a análise com EMP revelou presença de zinco e bário, a severidade da reação inflamatória tinha diminuído e foram qualificadas como moderadas, as áreas em contato com o Endo-Rez mostraram uma cápsula de tecido fibro-conectivo de 50-100µm de espessura que apresentavam pequenas células inflamatórias crônicas, principalmente macrófagos e presença de fibroblastos. Aos 120 dias, a análise com o EMP também revelou presença de zinco e bário, foi observado tecido conjuntivo normal em contato direto com o Endo-Rez e a maioria dos espécimes mostrou uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso de 100 a 200µm de espessura livre de células inflamatórias. Também foi observada uma cápsula fibrosa de espessura de 100 a 200µm ao redor dos espécimes utilizados como controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre a reação do

Endo-Rez e os espécimes controle nos períodos de observação de 10, 30 e 90 dias, mas não houve diferença significativa entre eles no período de 120 dias.

Bouillaguet et al.²⁶ em 2004, avaliaram a citotoxicidade e capacidade seladora de 4 cimentos endodônticos utilizando o teste de atividade da desidrogenase succínica (SDH) ou MTT assay, para avaliar a citotoxicidade, e o microscópio laser de varredura, para avaliar a infiltração do LPS marcado com o corante Rodamina B. Os cimentos testados foram Roeko Seal, Top Seal, Pulp Canal Sealer e Endo-Rez. Para o teste de citotoxicidade os cimentos foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes e colocados em corpos de prova, que consistia de um molde de teflon de 10mm de diâmetro e 1mm de espessura. Imediatamente após a presa, os discos de cimento foram colocados em contato com as células (fibroblastos de rato, 3T3), a atividade da SDH foi avaliada nos períodos de 24, 48 horas e 1 semana. Discos de teflon do mesmo tamanho dos discos de cimento foram utilizados como controle. Para avaliar a infiltração, foram utilizados 20 dentes humanos (caninos ou pré-molares), os quais foram instrumentados até o instrumento n° 30 com conicidade de .06 e obturados com cones de acrílico e os cimentos testados (5 dentes para cada cimento). Posteriormente, as raízes foram impermeabilizadas com esmalte de unha e submergidas por 48 horas a 37°C em uma solução com LPS e Rodamina B, cuidadosamente protegidas da luz. Decorrido o período de 48 horas, os espécimes foram lavados com água destilada e colocados em uma resina para serem seccionados e avaliados com o microscópio eletrônico confocal laser. Os resultados do teste de citotoxicidade demonstraram que todos os cimentos testados apresentaram uma grande inibição da atividade da SDH no período de observação de 24h após a presa, exceto o Roeko Seal que foi equivalente ao controle. Além disso, a atividade da SDH aumentou com o tempo em todos os cimentos testados, como também em todos os períodos de avaliação de 24, 48h e 1 semana. Os resultados da capacidade seladora dos cimentos demonstraram que todos eles permitiram infiltração do LPS e do corante Rodamina B, existindo uma grande variabilidade entre eles, que não foi estatisticamente significativa, no entanto, o cimento que apresentou as melhores características de biocompatibilidade e menor infiltração de LPS e Rodamina B foi o Roeko Seal.

Roggendorf et al.¹³⁸ em 2007, compararam a capacidade seladora apical e coronária dos cimentos AH Plus, Endo-Rez, EZ-Fill e Rely-X-Unicem. Para isso, utilizaram 30 dentes por grupo, instrumentados com limas de conicidade 0,04 mm/mm até o número45. Os dentes foram impermeabilizados e submetidos à infiltração do corante azul de metileno a 5%. Os resultados demosntraram que os cimentos AH Plus e EZ-Fill apresentaram os menores índices, seguidos do Rely-X-Unicem, sendo o cimento Endo-Rez o que maior grau de penetração apresentou.

Epiphany

Shipper et al.¹⁴⁷ em 2004, examinaram a resistência à penetração bacteriana em um novo material resinoso (Resilon). Foram utilizados *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* comparando a guta-percha e Resilon usando duas técnicas de obturação, durante um período de trinta dias. Foram utilizados um total de 156 dentes humanos unirradiculados cujas coroas foram removidas e os canais instrumentados até a lima K n° 40 ou 50 no comprimento de 16mm. As raízes foram divididas aleatoriamente em oito grupos de 15 raízes cada e três grupos controle de 12 cada. As raízes foram obturadas utilizando a técnica de condensação vertical e lateral com guta-percha e cimento AH 26 (Grupos um e dois), guta-percha e cimento Epiphany (Grupos 5 e 6). No modelo de infiltração, utilizou *S. mutans* nos grupos de um a seis e *E. faecalis* nos grupos sete e oito. Controles positivos foram obturados com Resilon e guta-percha sem cimento, enquanto os controles negativos foram selados com cera para testar o selamento entre as câmaras. Todas as raízes do grupo controle positivo infiltraram dentro de 24 horas, não havendo infiltração em nenhuma do controle negativo. O Resilon mostrou infiltração mínima, que foi significativamente menos que a da guta-percha. Todos os grupos do Resilon e cimento Epiphany mostraram uma infiltração significativamente menor que os grupos onde o AH-26 foi utilizado como cimento.

Shipper et al.¹⁴⁸ em 2005, avaliaram e compararam a eficácia in vivo da guta-percha e cimento AH 26 e do Resilon com o cimento e primer Epiphany na prevenção da periodontite apical subsequente a inoculação coronária com microrganismos orais. Foram utilizadas 56 raízes de pré-molares de sete cães adultos Beagle, que foram instrumentadas, obturadas e seladas temporariamente. Estas raízes foram aleatoriamente divididas em quatro grupos experimentais e um grupo controle negativo da seguinte forma: Grupo I – condensação lateral da guta-percha com o cimento AH 26; Grupo II – condensação vertical da guta-percha com o cimento AH 26; Grupo III – condensação lateral do Sistema “Monobloco” Resilon (SMR); Grupo IV – condensação vertical do SMR; Controle negativo – guta-percha e AH 26 ou SMR utilizando a técnica de condensação lateral ou vertical como nos grupos I a IV. No grupo do controle positivo foram utilizadas 57 raízes adicionais de pré-molares instrumentadas, infectadas e não obturadas. Os pré-molares dos

grupos I a IV foram selados com ionômero de vidro sendo, após sete dias, novamente abertos, inoculados com placa dental removida dos dentes dos cães e selados provisoriamente. Essa inoculação de microrganismos foi repetida mais duas vezes com intervalos mensais. Os dentes do grupo controle não foram abertos após selamento. Após 14 semanas de inoculação, os cães foram mortos e os blocos das maxilas e mandíbulas preparados para avaliação histológica sob um microscópio óptico. Inflamação leve foi observada em 82% das raízes obturadas com guta-percha e AH 26, que foi estatisticamente maior que raízes obturadas com o SMR (19%) e raízes do controle negativo (22%). O SMR foi o que apresentou a menor periodontite apical, atribuída à sua resistência superior à microinfiltração coronária.

O selamento apical do Resilon/Epiphany foi comparado com o da guta-percha/AH Plus num estudo *in vitro*, realizado por Tay et al.¹⁶⁵ em 2005. Foram utilizados 24 dentes humanos unirradiculados extraídos, instrumentados com as limas rotatórias de níquel-titânio do sistema Profile. Após a instrumentação, os canais foram aleatoriamente divididos em dois grupos de 10 dentes cada, sendo o 1º grupo, obturado pela técnica da compactação vertical aquecida do Resilon com o cimento Epiphany e o 2º grupo, obturado com a mesma técnica, porém com cone de guta-percha e o cimento AH Plus. Dois espécimes de Resilon e dois de guta-percha foram escolhidos para exame ao microscópio eletrônico de varredura, sendo seccionados longitudinalmente para expor a interface dentina radicular/obturação. Nos 10 dentes remanescentes de cada grupo a infiltração apical foi avaliada, utilizando a técnica de penetração de prata, por meio do microscópio eletrônico de transmissão. Pode-se observar, no microscópio eletrônico de varredura, excelente adaptação do Resilon ao Epiphany. Havia entretanto, a presença de regiões livres e de espaços vazios ao longo da interface dentina/cimento no mesmo dente, e da formação de tags de resina nas regiões livres de espaços vazios e tags espaçados ou ausentes nas regiões com os espaços vazios. Igualmente, regiões com espaços vazios e livres de espaços foram encontradas nos espécimes do grupo da guta-percha (controle), sendo a separação da guta-percha com o AH Plus frequentemente observada. Ao microscópio eletrônico de transmissão, foi observada infiltração em nove dos 10 canais obturados com o Resilon e em todos os 10 canais obturados com guta-percha. As infiltrações em ambos os grupos estavam confinadas aos

4mm apicais, onde a presença de depósitos de prata, no grupo Resilon/Epiphany, estava presente na interface camada híbrida/cimento, e no grupo controle, entre o cimento e a guta-percha. Os autores concluíram que não pode ser obtido um selamento apical hermético completo com ambos materiais.

Proposição

Tendo em vista os argumentos utilizados na introdução, os resultados controversos observados na literatura e o papel chave dos macrófagos na biocompatibilidade e citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares, esta pesquisa propõe-se a:

- Verificar a presença de citotoxicidade de cada cimento endodôntico inicialmente em culturas de macrófagos utilizando o teste MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio).
- Avaliar a resposta imune dos macrófagos frente a diferentes cimentos endodônticos.
- Avaliar a indução dos mediadores celulares NO, TNF- α e IFN- γ utilizando concentrações não tóxicas.

Material e método

Cimentos Endodônticos

Foram utilizados os seguintes cimentos endodônticos: EndoRez Dual (Ultradent), Sealapex (Sybron Kerr Co.), AH Plus (Dentsply-USA), Epiphany (Pentron Co. Kerr) e Polímero de Mamona.

Preparo dos cimentos

EndoRez^{TM*}: Por ser um cimento de tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocadas partes iguais (6 cm) de pasta base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro e com auxílio de uma espátula metálica No. 24 se incorporaram (ou foram incorporadas) uma à outra até obtenção de uma mistura homogênea.

Sealapex^{}**: Por ser um cimento do tipo pasta/pasta, foram colocadas partes iguais (6 cm) de pasta base e pasta catalisadora sobre uma placa de vidro e com auxílio de uma espátula foram incorporadas uma à outra até obtenção de uma mistura homogênea.

AH Plus^{*}**: Por ser um cimento do tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocadas partes iguais (6 cm) de pasta base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro e com auxílio de uma espátula metálica No. 24 foram incorporadas uma à outra até obtenção de uma mistura homogênea.

Epiphany^{**}**: É um cimento à base de resina (Metacrilato). Por ser cimento do tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocados 6 cm de pasta base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro e com auxílio de uma espátula metálica No. 24 foram incorporados um ao outro até obtenção de uma mistura homogênea.

Polímero de Mamona^{***}**: É um cimento do tipo pasta/líquido (base e catalisador). Foram colocados 1 ml de poliol misturados com 2,75 g de Óxido de Zinco e 1 ml de pré-polímero sobre uma placa de vidro, e com auxílio de uma espátula metálica No. 24, se incorporaram um ao outro até obter-se uma mistura homogênea.

* EndoRez- Ultradent Products, Inc., South Jordan, UTA, USA.

** Sealapex, Dentsply, USA

***AH Plus, Sybron Kerr, USA

****Epiphany, Pentron, USA

*****Polímero de Mamona- Poliquil Araraquara Polímeros Químicos Ltda. Araraquara, SP,

Composição dos cimentos

SEALAPEX

Catalisador

Sulfato de Bário
Resina Polimetilenometilsalicilato
Dióxido de titânio
Sílica, Pigmentos
Salicilato de Isobutila

Base

Óxido de Cálcio
Óxido de Zinco
Composto à base de Sulfonamida e Sílica

AH Plus

Pasta A

Diglicidil éter de:
Bisfenol-A
Bisfenol-F
Tungstato de cálcio
Óxido de Zircônio
Aerosil
Pigmentos

Pasta B

N,N - dibenzyl-5-oxanonan- diamine-1,9 (OPC-91)
1-adamantanamine
TCD-diamine
Tungstato de cálcio
Óxido de zircônio
Aerosil
Óleo silicone

ENDO-REZ

(Ultradent Products, INC.)

UDMA (Urethane dimetacrylate).....30%

Chlorhexidine.....1%

Epiphany**Cimento**

UDMA

PEGDM

EBPADMA

BISGMA

Silano com partículas de barioborosilicatos

Sulfato de bário

Silica

Hidróxido de cálcio

Oxicloreto de bismuto com aminas

Peróxido

Foto iniciador

Estabilizadores

Pigmentos

Primer

Camphorquinone

Água

AMPS

HEMA

Obtenção das soluções dos cimentos

Os cimentos foram inicialmente pesados em uma balança de precisão (Metler AJ150, da Metler-Toledo AG, USA) e diluídos em Polietilenoglicol 400 à uma concentração de 18mg/ml. Com o auxílio de um sonicador (Sonic & Materials, Vibra Cell*), o cimento foi solubilizado, e a seguir, a solução foi autoclavada por 20 minutos à 121° C.

A partir dessa concentração de 18mg/ml, foram realizadas diversas diluições em RPMI 1640 (Sigma) até se conseguir a concentração exata para cada cimento.

* Sonic & Materials Inc. Danbury, CT. USA

Animais

Neste trabalho de pesquisa foram utilizados 24 camundongos, sendo 4 animais para cada grupo experimental (5 cimentos diferentes), mais um grupo controle.

Foram utilizados camundongos não isogênicos tipo Swiss machos de 6 semanas de idade, pesando entre 18 e 25g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado, ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

A morte dos animais foi realizada por aprofundamento de anestesia com Hidrato de Cloral à 10%, utilizando uma sobredose de 0,7 ml/100g de peso do animal. Todos esses procedimentos estão fundamentados nas orientações do “Manual sobre cuidado y uso de los animales de experimentación” (Olfert et al.¹¹⁷, 1998).

Obtenção de células do exsudato peritoneal

Os animais foram estimulados previamente por meio da inoculação, por via intraperitoneal, de 3.0 ml de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco). Após 3 dias, os animais foram mortos por aprofundamento de anestesia e transferidos para a câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) A seguir, foi retirada a pele da região abdominal e foram adicionados 5.0ml de solução tamponada de fosfatos (PBS) estéril, Ph 7.2. A seguir foi feita suave massagem manual na região abdominal e o líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha e transferido para tubo estéril (Corning, Inc) para lavagem das células, com tampão PBS, pH 7.2. A lavagem das células foi realizada centrifugando-se 3 vezes a 200xg durante cinco minutos em centrífuga (Fanem). As células sedimentadas foram resuspensas em meio de cultura RPMI -1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cutilab), 100 ml/ml de estreptomicina, 100 ml/ml de penicilina e 2 mM de L-glutamina e assim designado como meio completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany), sendo ajustado à 5.10^6 células em meio RPMI-1640-C.

Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais

As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/ml em meio RPMI-1640-C e foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade da placa foi adicionado 1,0 ml da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C. Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado volume igual ao inicial de RPMI-1640-C e 100 µl das soluções de cada cimento endodôntico, ou 100 µl de uma solução de LPS (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) como controle positivo ou, ainda, somente meio RPMI-1640 como controle negativo. As placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por mais 24 h. Após esta incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C durante 20 min a 4000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, dosado o NO, uma alíquota foi estocada em freezer a -80°C até o momento da determinação de TNF- α .

Obtenção de células esplênicas

Os animais foram mortos por aprofundamento de anestesia e transferidos para a câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) onde se procedeu à retirada da pele da região abdominal e, em seguida, a abertura do peritônio com a extração do Baço. O Baço foi pinçado por auxílio de instrumentação cirúrgica em placa de Petri estéril contendo 3,0 ml de meio de RPMI-1640-C(Sigma). O conteúdo da placa foi transferido, com seringa, para tubo cônico estéril (Corning, Inc) para lavagem das células com tampão PBS pH 7,2. A lavagem das células foi feita centrifugando-se três vezes a 200xg por cinco minutos (Fanem). As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640-C e o número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer, sendo ajustado à concentração de 5×10^6 em meio RPMI-C para a determinação de IFN- γ .

Obtenção do sobrenadante das células esplênicas

A suspensão celular contendo as células esplênicas ajustadas a 5×10^6 células/ml, foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, Inc), 1,0 ml por cavidade e 100 μ l das soluções de cimentos endodônticos, ou 100 μ l de uma solução de Concanavalina A (ConA) na concentração de 0,5 μ g/ml (usada como controle positivo) ou ainda somente meio de cultura RPMI-1640 como controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por 24 h. Após esta incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Hettich, Inc.) a 4°C durante 20 min a 4000 rpm. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados a -80°C para posterior dosagem de IFN- γ .

Determinação da citotoxicidade pelo MTT

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana.

O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um sal que é usado para desenvolver um ensaio quantitativo colorimétrico da proliferação e viabilidade das células de mamíferos. Este método pode ainda ser usado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação das células. Os resultados são lidos em placas de cultivo num leitor de ELISA e demonstra um elevado grau de precisão.

A uma placa de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100µl por cavidade das suspensões do exsudato peritoneal obtidas dos animais, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/ml em meio de cultura RPMI-1640-C.

Após, foram distribuídos 100µl por cavidade de placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Corning Inc.) em presença de 100µl dos diferentes cimentos nas diferentes concentrações de 18, 9, 4,5, 2,25, 1,125, 0,5625 mg/ml e de LPS a 10µg/ml ou somente meio de cultura RPMI-1640-C, em triplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de NO e as células aderentes tratadas com 100µl de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (Across Organics) a 0,5mg/ml em RPMI-1640. A placa foi incubada por mais três horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 µl de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro UV/visível (Multiskan Ascent Labsystems) a 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

Método colorimétrico de MTT (Viabilidade de linfócitos extraídos de baço)

Foi utilizado o método descrito por Mosmann¹¹¹, em 1983. Depois de incubar os linfócitos com os diferentes cimentos nas concentrações de 18, 9, 4,5, 2,25, 1,125, 0,5625 mg/ml, ConA a 0,5µg/ml ou somente meio de cultura RPMI-1640 por 24 horas em estufa por 24hs em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂, foram adicionados 20 µl de uma solução de MTT (5mg/ml de RPMI 1640)/well e as placas foram incubadas por 3 horas em estufa à 37°C, 5% de CO₂. A seguir, as placas foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos a 10°C para, posteriormente, retirar-se o sobrenadante por aspiração com auxílio de uma micropipeta. Depois de aspirado o sobrenadante, foram adicionados 100 µl de álcool isopropílico em cada well e foi realizada a leitura em leitor de ELISA utilizando comprimento de onda de 540 nm.

Determinação da produção de Óxido Nítrico

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células através da reação de diazotação com o reagente de Griess (composto de 1 g de sulfanilamida (Merck), 0,1 g de dicloro N(1-naftil) etilenodiamina (Merck), 2,5 ml de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100 ml.

Alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal foram transferidas para outra placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 min de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada em UV/visível com filtro de 540nm em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio e os valores expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células (Green et al.⁵⁶, 1982).

Determinação da liberação de citocinas

A citocina TNF- α foi quantificada nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, enquanto que o IFN foi quantificado nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas através do teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina. Para isso será utilizado o kit BD Pharmingen de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 (PBS) (100 μ l por cavidade) e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 μ l/cavidade de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) a temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 μ l do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 120 min, e lavadas 3 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μ l/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 120 min e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μ l/cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1/200 em diluente de reagente e incubadas novamente a temperatura ambiente por 20 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100 μ L do substrato [10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2 mM de H₂O₂ (Mallinckrodt Chemical)] a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 μ l de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações de cada citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/ml.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Forma de Análise dos Resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tukey). Todos os experimentos foram realizados usando cinco animais por cimento testado e cada determinação será executada em triplicata. Os gráficos foram confeccionados com o auxílio do programa Microcal Origin 7.0.

Resultado

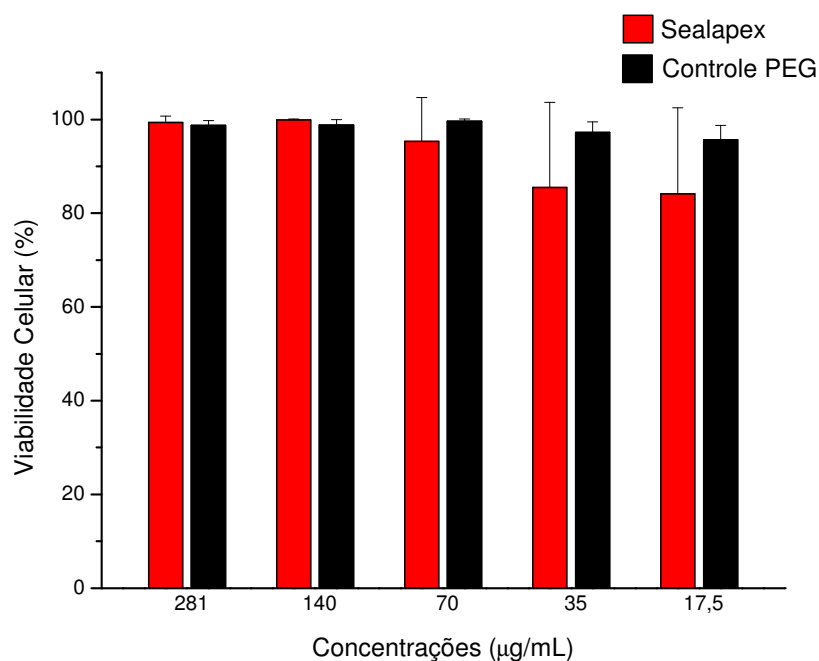


FIGURA 1 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Sealapex. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Sealapex nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml e 17,5µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 1 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações de Sealapex

Viabilidade Celular (%) – Sealapex				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml Sealapex	4	99,325	1,350	0,675
1,56% PEG	4	98,700	1,013	0,507
140 µg/ml Sealapex	4	99,912	0,175	0,088
0,78% PEG	4	98,800	1,175	0,587
70 µg/ml Sealapex	4	95,302	9,395	4,698
0,39% PEG	4	99,575	0,506	0,253
35 µg/ml Sealapex	4	85,510	18,177	9,088
0,19% PEG	4	97,250	2,217	1,108
17,5 µg/ml Sealapex	4	84,165	18,284	9,142
0,10% PEG	4	95,650	3,026	1,513

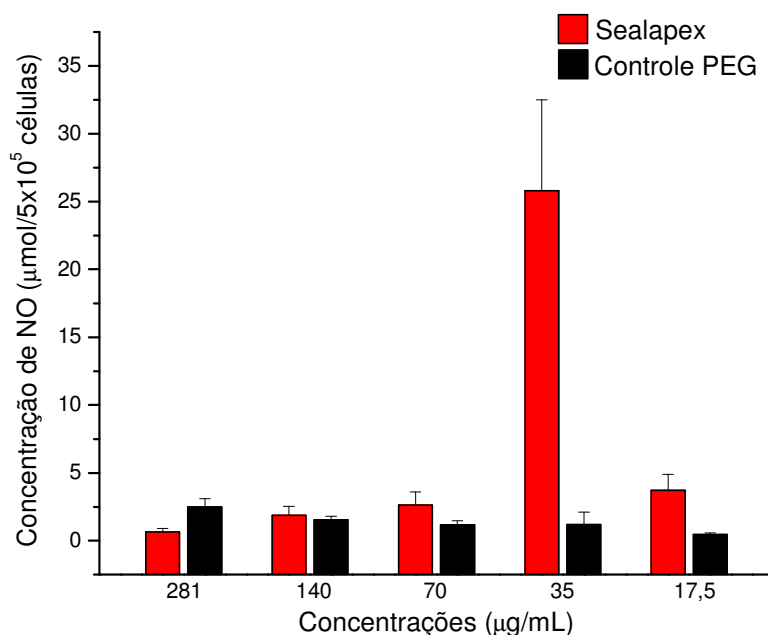


FIGURA 2 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Sealapex. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Sealapex nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 2 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações de Sealapex

Produção de NO – Sealapex				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de Sealapex	6	0,664	0,251	0,102
1,56% PEG	6	2,485	0,617	0,252
140 µg/ml de Sealapex	6	1,896	0,640	0,261
0,78% PEG	6	1,540	0,268	0,101
70 µg/ml de Sealapex	6	2,628	0,967	0,395
0,39% PEG	6	1,177	0,297	0,112
35 µg/ml de Sealapex	6	25,799	6,691	2,732
0,19% PEG	6	1,200	0,913	0,345
17,5 µg/ml de Sealapex	6	3,723	1,174	0,479
0,10% PEG	6	0,471	0,112	0,043

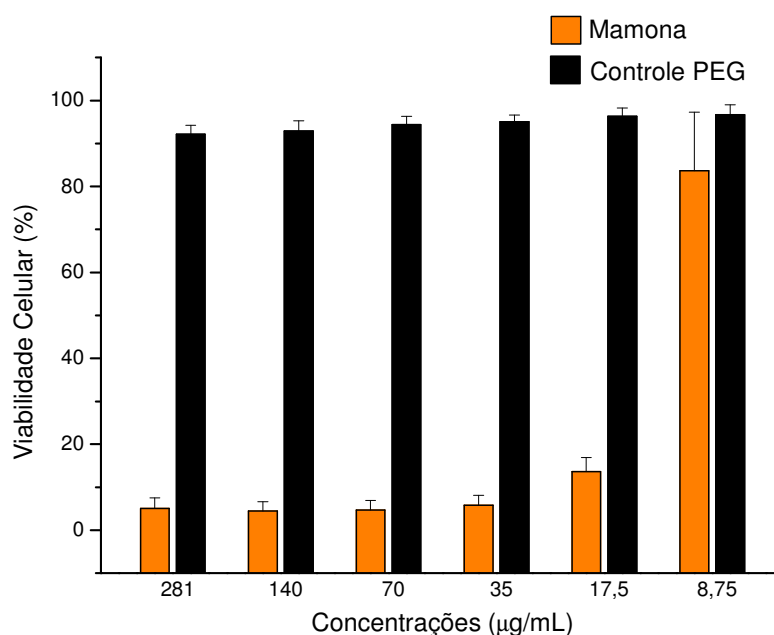


FIGURA 3 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações do Polímero de Mamona. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Polímero de Mamona nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml, 17,5µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 3 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações do Polímero de Mamona

Viabilidade Celular (%) – Polímero de Mamona				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml Mamona	8	5,017	2,567	0,9084
1,56% PEG	8	92,150	2,096	0,741
140 µg/ml Mamona	8	4,512	2,121	0,750
0,78% PEG	8	92,862	2,431	0,860
70 µg/ml Mamona	8	4,681	2,232	0,789
0,39% PEG	8	94,412	1,908	0,675
35 µg/ml Mamona	8	5,835	2,289	0,810
0,19% PEG	8	95,025	1,600	0,566
17,5 µg/ml Mamona	8	13,624	3,274	1,158
0,10% PEG	8	96,312	1,888	0,668
8,75 µg/ml Mamona	8	83,642	13,615	4,814
0,05% PEG	8	96,725	2,268	0,802

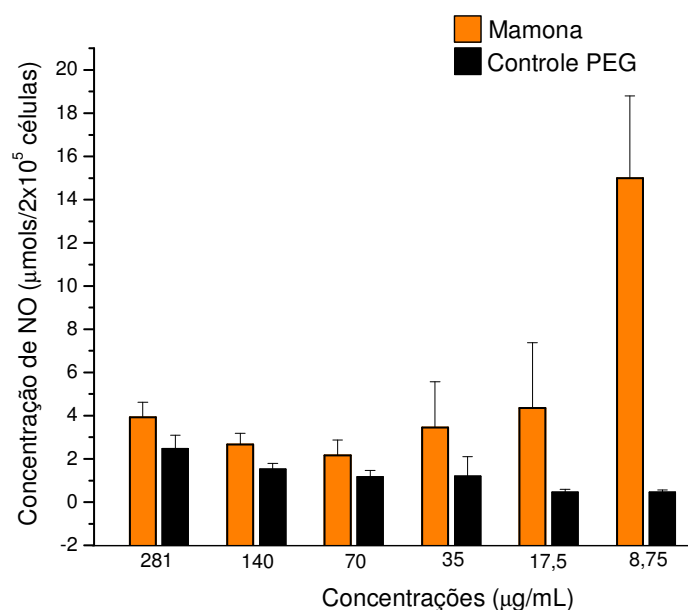


FIGURA 4 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações do Polímero de Mamona. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Polímero de Mamona nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% , 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 4 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações do Polímero de Mamona

Produção de NO – Polímero de Mamona				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de Mamona	7	3,928	0,694	0,283
1,56% PEG	7	2,485	0,617	0,252
140 µg/ml de Mamona	7	2,665	0,524	0,298
0,78% PEG	7	1,540	0,268	0,101
70 µg/ml de Mamona	7	2,167	0,702	0,265
0,39% PEG	7	1,117	0,297	0,112
35 µg/ml de Mamona	7	3,457	2,11	0,798
0,19% PEG	7	1,200	0,913	0,345
17,5 µg/ml de Mamona	7	4,350	3,033	1,146
0,10% PEG	7	0,471	0,112	0,042
8,75 µg/ml de Mamona	5	15,002	3,796	1,697
0,05% PEG	5	0,458	0,105	0,047

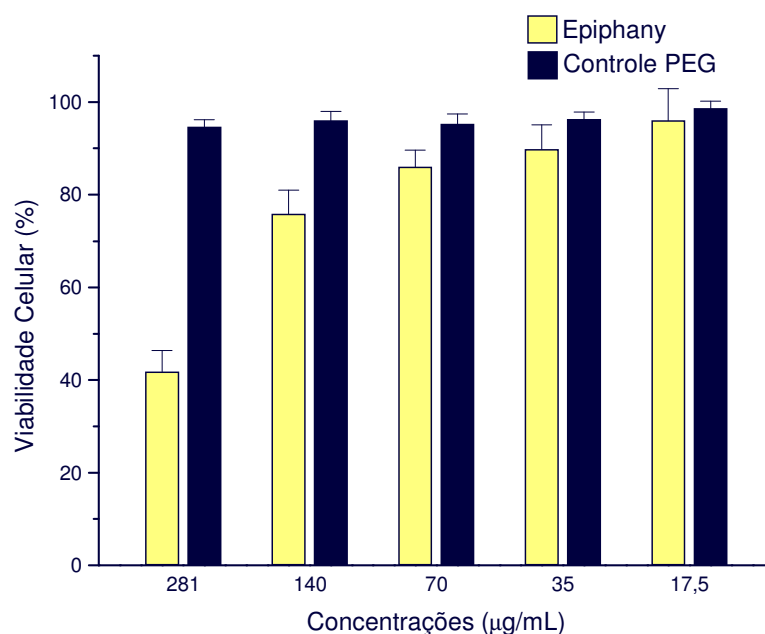


FIGURA 5 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Epiphany. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Epiphany nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml e 17,5µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 5 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações de Epiphany

Viabilidade Celular (%) – Epiphany				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml Epiphany	3	41,787	4,589	2,649
1,56% PEG	3	94,667	1,528	0,882
140 µg/ml Epiphany	3	75,837	5,206	3,006
0,78% PEG	3	96,000	2,000	1,155
70 µg/ml Epiphany	3	85,983	3,626	2,094
0,39% PEG	3	95,333	2,082	1,202
35 µg/ml Epiphany	3	89,830	5,257	3,035
0,19% PEG	3	96,333	1,528	0,882
17,5 µg/ml Epiphany	3	95,997	6,934	4,003
0,10% PEG	3	98,667	1,528	0,882

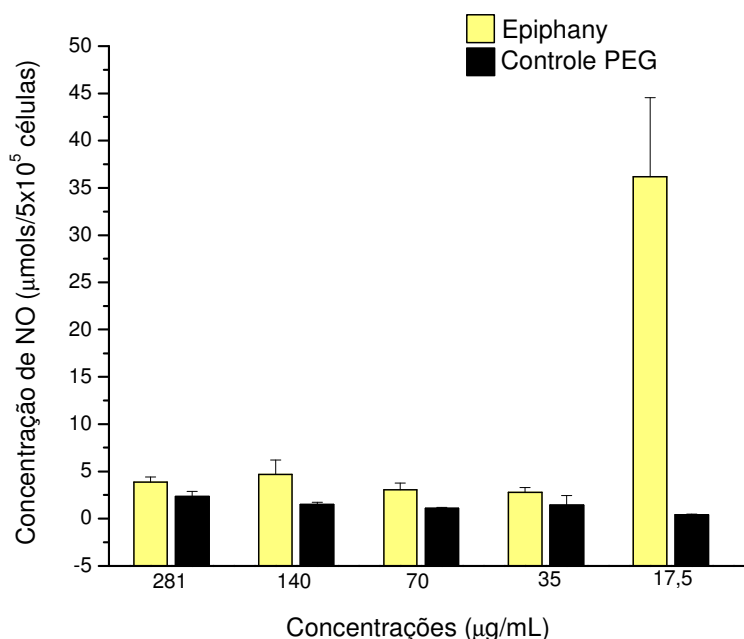


FIGURA 6 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Epiphany. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Epiphany nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO_2) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 6 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações de Epiphany

Produção de NO – Epiphany				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de Epiphany	5	3,865	0,554	0,248
1,56% PEG	5	2,329	0,541	0,242
140 µg/ml de Epiphany	5	4,681	1,151	0,676
0,78% PEG	5	1,477	0,268	0,120
70 µg/ml de Epiphany	5	3,042	0,746	0,334
0,39% PEG	5	1,107	0,095	0,042
35 µg/ml de Epiphany	5	2,798	0,508	0,227
0,19% PEG	5	1,400	1,036	0,463
17,5 µg/ml de Epiphany	5	36,181	8,363	3,740
0,10% PEG	5	0,419	0,080	0,035

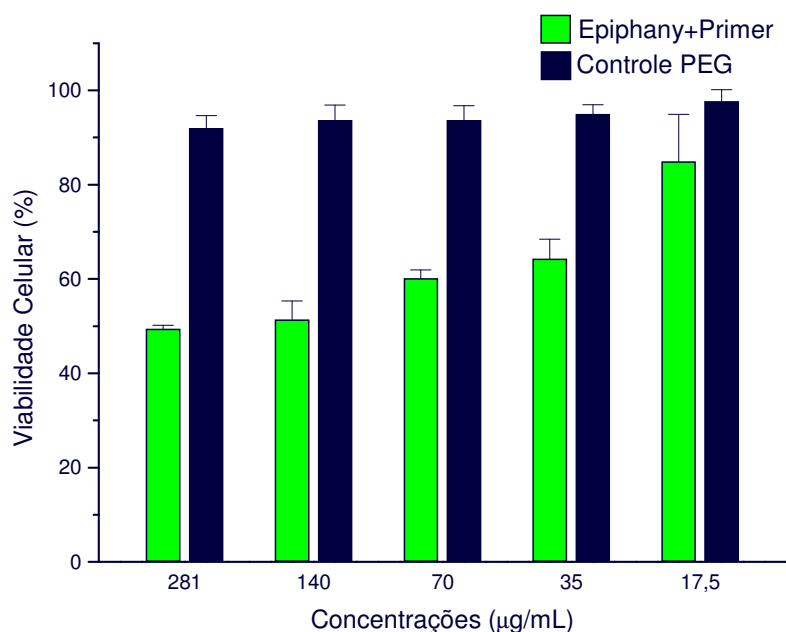


FIGURA 7 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Epiphany + Primer. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Epiphany + Primer nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml e 17,5µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 7 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações de Epiphany + Primer

Viabilidade Celular (%) – Epiphany + Primer				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml Epiphany + Primer	3	49,407	0,783	0,452
1,56% PEG	3	92,000	2,646	1,528
140 µg/ml Epiphany + Primer	3	51,387	3,956	2,284
0,78% PEG	3	93,667	3,215	1,856
70 µg/ml Epiphany + Primer	3	60,160	1,765	1,019
0,39% PEG	3	93,667	3,055	1,764
35 µg/ml Epiphany + Primer	3	64,263	4,154	2,398
0,19% PEG	3	95,000	2,000	1,155
17,5 µg/ml Epiphany + Primer	3	84,910	9,997	5,772
0,10% PEG	3	97,667	2,517	1,453

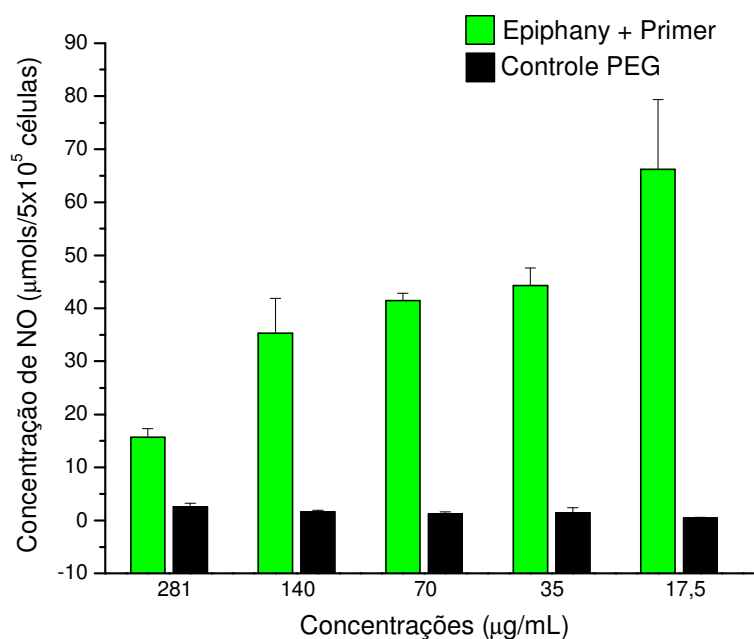


FIGURA 8 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Epiphany + Primer. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Epiphany + Primer nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 8 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações de Epiphany + Primer

Produção de NO – Epiphany+Primer				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de Epiphany+Primer	6	15,690	1,623	0,726
1,56% PEG	6	2,583	0,636	0,284
140 µg/ml de Epiphany+Primer	6	35,307	6,532	2,921
0,78% PEG	6	1,619	0,260	0,116
70 µg/ml de Epiphany+Primer	6	41,468	1,379	0,617
0,39% PEG	6	1,270	0,306	0,137
35 µg/ml de Epiphany+Primer	6	44,282	3,336	1,491
0,19% PEG	6	1,447	0,983	0,440
17,5 µg/ml de Epiphany+Primer	6	66,217	13,149	5,880
0,10% PEG	6	0,458	0,092	0,411

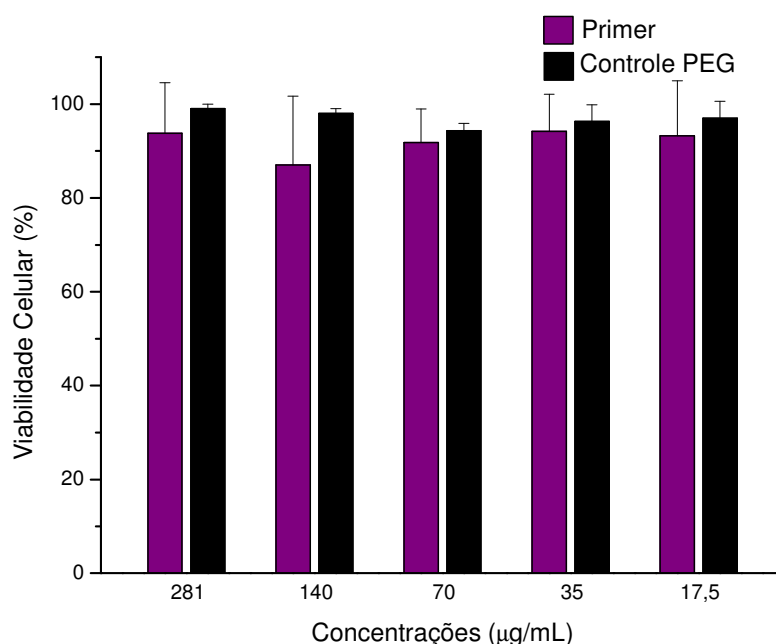


FIGURA 9 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Primer. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de Primer nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml e 17,5µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 9 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações de Primer

Viabilidade Celular (%) – Primer				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml Primer	3	93,77333	10,785	6,227
1,56% PEG	3	99,000	1,000	0,577
140 µg/ml Primer	3	87,030	14,701	8,488
0,78% PEG	3	98,000	1,000	0,577
70 µg/ml Primer	3	91,797	7,190	4,151
0,39% PEG	3	94,333	1,528	0,882
35 µg/ml Primer	3	94,183	7,892	4,556
0,19% PEG	3	96,333	3,512	2,028
17,5 µg/ml Primer	3	93,260	11,674	6,740
0,10% PEG	3	97,000	3,606	2,082

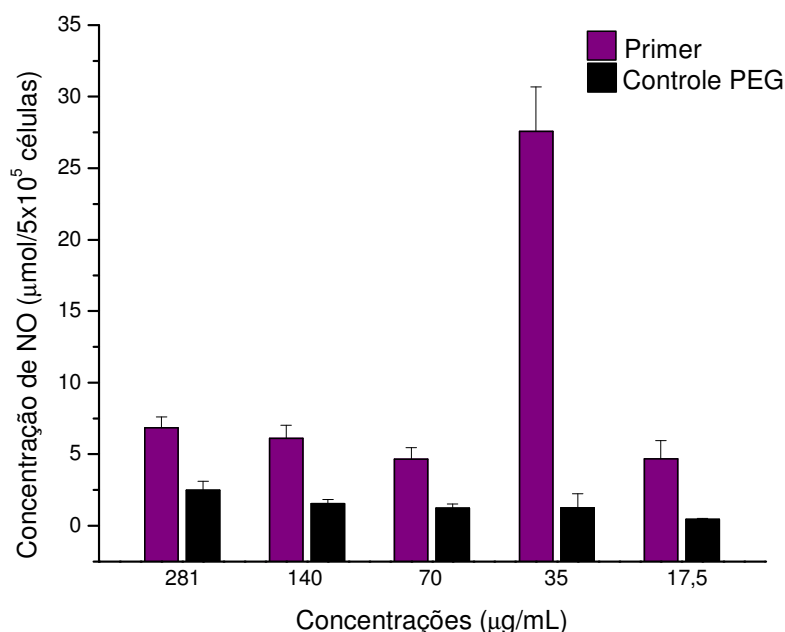


FIGURA 10 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de Primer. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença Primer nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 10 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações de Primer

Produção de NO –Primer				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de Primer	6	6,854	0,765	0,312
1,56% PEG	6	2,485	0,617	0,252
140 µg/ml de Primer	6	6,118	0,910	0,371
0,78% PEG	6	1,546	0,293	0,120
70 µg/ml de Primer	6	4,647	0,806	0,329
0,39% PEG	6	1,223	0,297	0,121
35 µg/ml de Primer	6	27,552	3,130	1,278
0,19% PEG	6	1,274	0,977	0,399
17,5 µg/ml de Primer	6	4,68	1,290	0,527
0,10% PEG	6	0,442	0,910	0,037

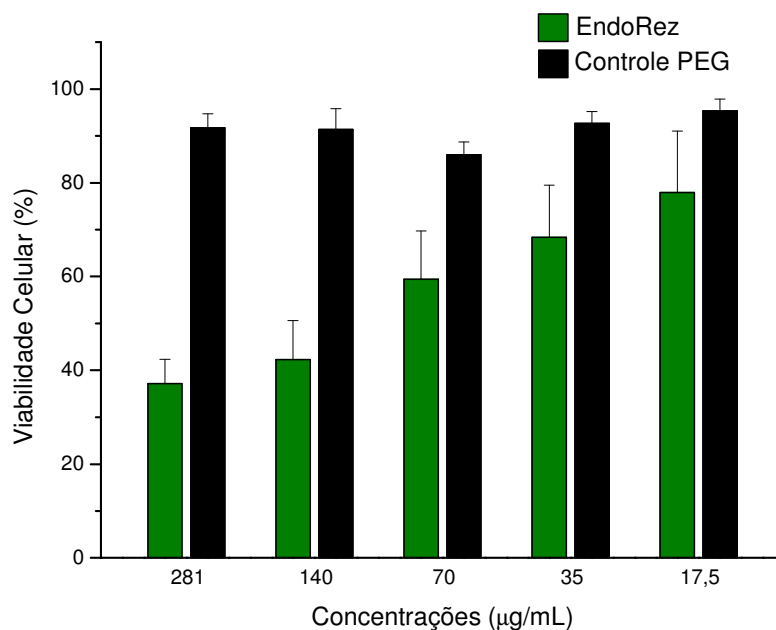


FIGURA 11 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de EndoRez. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de EndoRez nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml e 17,5µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 11 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações de EndoRez

Viabilidade Celular (%) – EndoRez				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml EndoRez	3	37,180	5,135	2,965
1,56% PEG	3	91,667	3,055	1,764
140 µg/ml EndoRez	3	42,283	8,344	4,817
0,78% PEG	3	91,333	4,509	2,603
70 µg/ml EndoRez	3	59,423	10,310	5,953
0,39% PEG	3	86,000	2,646	1,528
35 µg/ml EndoRez	3	68,373	11,118	6,419
0,19% PEG	3	92,667	2,517	1,453
17,5 µg/ml EndoRez	3	77,873	13,155	7,595
0,10% PEG	3	95,333	2,517	1,453

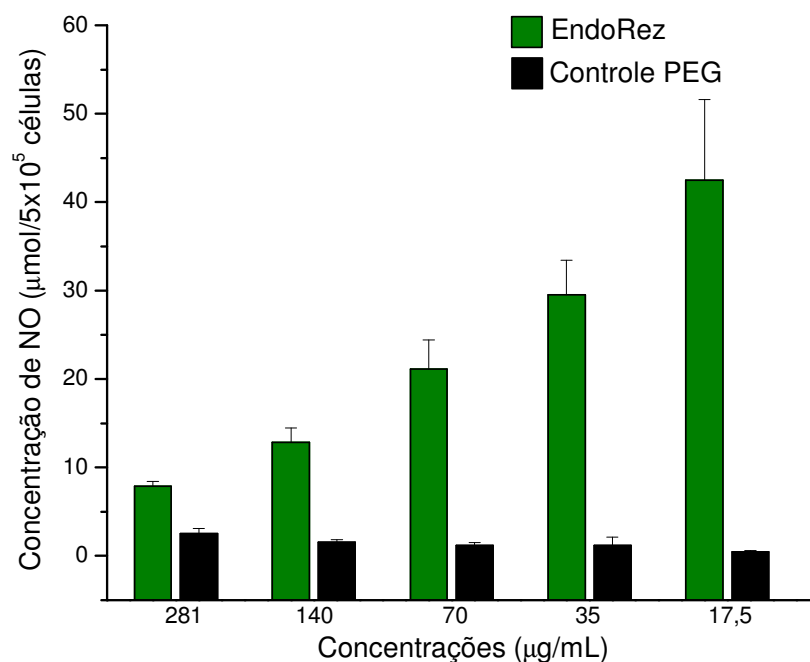


FIGURA 12 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de EndoRez. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença EndoRez nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 12 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações de EndoRez

Produção de NO – EndoRez				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de EndoRez	8	7,849	0,570	0,233
1,56% PEG	8	2,485	0,617	0,252
140 µg/ml de EndoRez	8	12,821	1,648	0,673
0,78% PEG	8	1,540	0,268	0,101
70 µg/ml de EndoRez	8	21,142	3,283	1,340
0,39% PEG	8	1,177	0,297	0,112
35 µg/ml de EndoRez	8	29,554	3,86	1,576
0,19% PEG	8	1,200	0,913	0,345
17,5 µg/ml de EndoRez	8	42,459	9,13	3,451
0,10% PEG	8	0,471	0,112	0,042

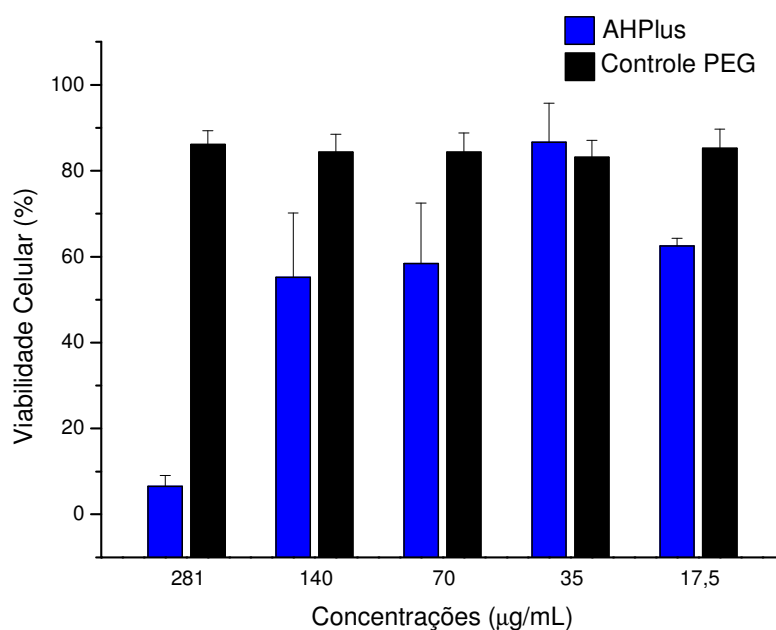


FIGURA 13 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de AH Plus. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença de AH Plus nas concentrações de 281µg/ml, 140µg/ml, 70µg/ml, 35µg/ml e 17,5µg/ml, ou somente meio RPMI-C contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19% e 0,10% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados foram expressos em percentual, como média \pm desvio padrão.

Tabela 13 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes concentrações de AH Plus

Viabilidade Celular (%) – AH Plus				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml AH Plus	4	6,490	2,573	1,286
1,56% PEG	4	86,135	3,157	1,578
140 µg/ml AH Plus	4	55,182	14,989	7,494
0,78% PEG	4	84,325	4,150	2,075
70 µg/ml AH Plus	4	58,392	14,090	7,045
0,39% PEG	4	84,288	4,516	2,258
35 µg/ml AH Plus	4	86,702	9,022	4,511
0,19% PEG	4	83,082	4,032	2,016
17,5 µg/ml AH Plus	4	62,510	1,737	0,868
0,10% PEG	4	85,200	4,490	2,245

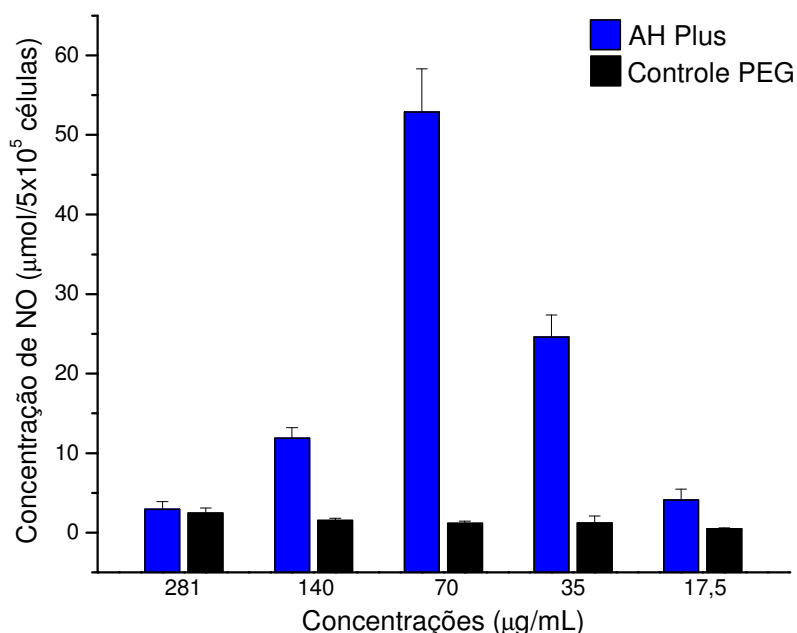


FIGURA 14 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes concentrações de AH Plus. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença AH Plus nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, ou somente meio RPMI contendo 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10% e 0,05% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 14 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em µmols de nitrito/5x10⁵ células) em presença de diferentes concentrações de AH Plus

Produção de NO – AH Plus				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
281 µg/ml de AH Plus	8	2,957	0,950	0,388
1,56% PEG	8	2,485	0,617	0,251
140 µg/ml de AH Plus	8	11,883	1,311	0,535
0,78% PEG	8	1,54	0,68	0,101
70 µg/ml de AH Plus	8	52,903	5,402	2,205
0,39% PEG	8	1,177	0,297	0,112
35 µg/ml de AH Plus	8	24,602	2,765	1,129
0,19% PEG	8	1,200	0,913	0,345
17,5 µg/ml de AH Plus	8	4,106	1,365	0,557
0,10% PEG	8	0,471	0,112	0,042

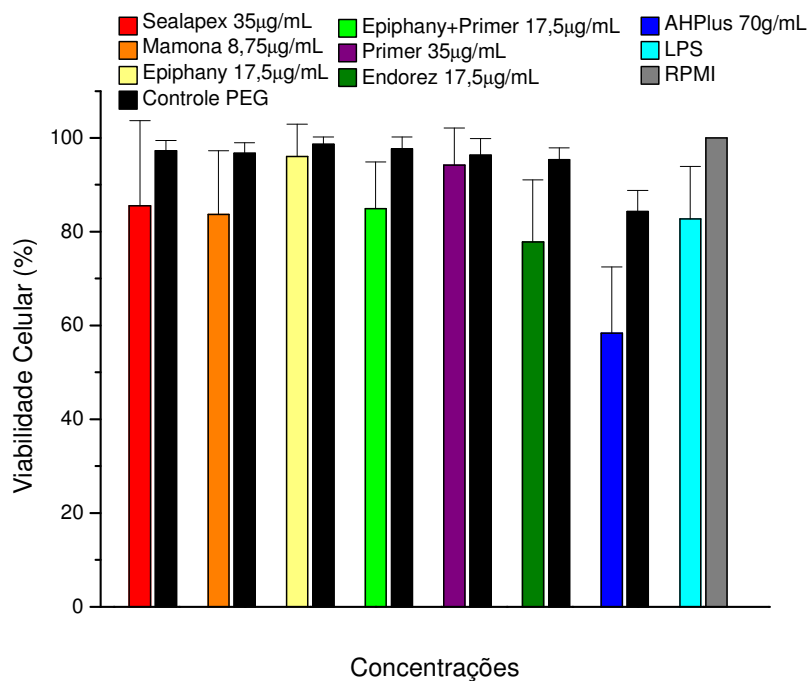


FIGURA 15 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença dos diferentes cimentos. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença do Sealapex, do Polímero de Mamona, do Epiphany, do Epiphany + Primer, do Primer, do EndoRez, do AH Plus e do LPS (como controle positivo) nas concentrações de 35 µg/ml, 8,75 µg/ml, 17,5 µg/ml, 17,5 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml, 70 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, ou somente meio RPMI contendo 0,19%, 0,05%, 0,10%, 0,10%, 0,19%, 0,10%, 0,38% e 0% de PEG, respectivamente, como controle. Os resultados então expressos em percentual como média ± desvio padrão.

Tabela 15 – Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes cimentos e LPS

Viabilidade Celular (%) – Cimentos				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
Sealapex 35µg/ml	4	85,510	18,177	9,089
0,19% PEG	4	97,250	2,217	1,109
Mamona 8,75 µg/ml	8	83,642	13,615	4,814
0,05% PEG	8	96,725	2,268	0,802
Epiphany 17,5 µg/ml	3	95,997	6,934	4,003
0,10% PEG	3	98,667	1,528	0,882
Epiphany+Primer 17,5 µg/ml	3	84,910	9,997	5,772
0,10% PEG	3	97,667	2,517	1,453
Primer 35 µg/ml	3	94,183	7,892	4,556
0,19% PEG	3	96,333	3,512	2,028
EndoRez 17,5 µg/ml	3	77,873	13,155	7,595
0,10% PEG	3	95,333	2,517	1,453
AH Plus 70 µg/ml	4	58,392	14,090	7,045
0,38% PEG	4	84,288	4,516	2,258
LPS	8	82,720	11,208	4,236
RPMI	8	100,00	0	0

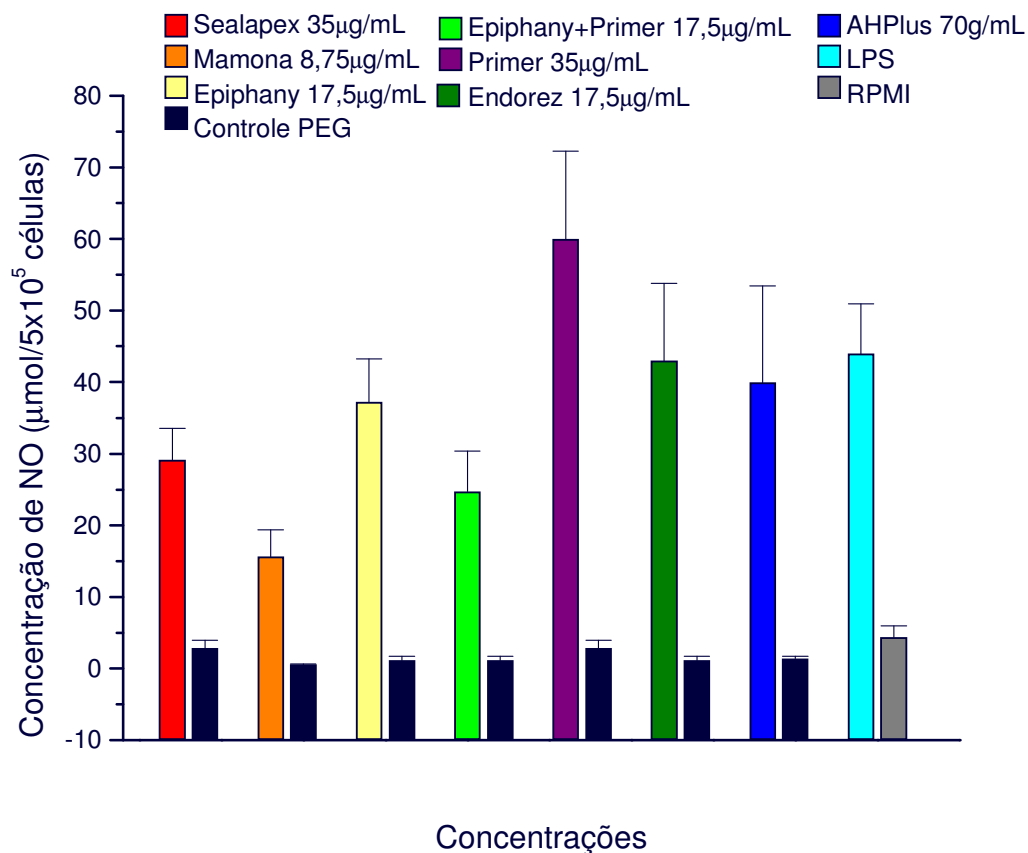


FIGURA 16 - Produção de óxido nítrico por células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss machos em presença de diferentes cimentos. As células do exsudato peritoneal foram cultivadas em presença do Sealapex, Polímero de Mamona, do Epiphany, do Epiphany+Primer, do Primer, do EndoRez, do AH Plus e do LPS, como controle positivo, nas concentrações de 35 µg/ml, 8,75 µg/ml, 17,5 µg/ml, 17,5 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml, 70 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente, ou somente meio RPMI contendo 0,19%, 0,05%, 0,10%, 0,10%, 0,19%, 0,10%, 0,38% e 0% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de nitrito foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂) e os resultados expressos em µmols de nitrito/5x10⁵ células, como média ± desvio padrão.

Tabela 16 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de óxido nítrico (em $\mu\text{mols de nitrito}/5 \times 10^5$ células) em presença de diferentes cimentos e LPS

Produção de NO – Cimentos				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
Sealapex 35 $\mu\text{g/ml}$	6	29,149	4,390	1,964
0,19% PEG	6	2,846	1,108	0,496
Mamona 8,75 $\mu\text{g/ml}$	6	15,649	3,759	1,681
0,05% PEG	6	0,530	0,138	0,062
Epiphany 17,5 $\mu\text{g/ml}$	6	37,250	5,974	2,672
0,10% PEG	6	1,138	0,564	0,252
Epiphany+Primer 17,5 $\mu\text{g/ml}$	6	24,707	5,629	2,517
0,10% PEG	6	1,138	0,564	0,252
Primer 35 $\mu\text{g/ml}$	6	59,986	12,311	5,506
0,19% PEG	6	2,846	1,108	0,496
EndoRez 17,5 $\mu\text{g/ml}$	6	42,973	10,819	4,838
0,10% PEG	6	1,138	0,564	0,252
AH Plus 70 $\mu\text{g/ml}$	6	39,977	13,447	6,014
0,38% PEG	6	1,382	0,318	0,142
LPS	5	43,972	6,966	3,115
RPMI	5	4,336	1,634	0,730

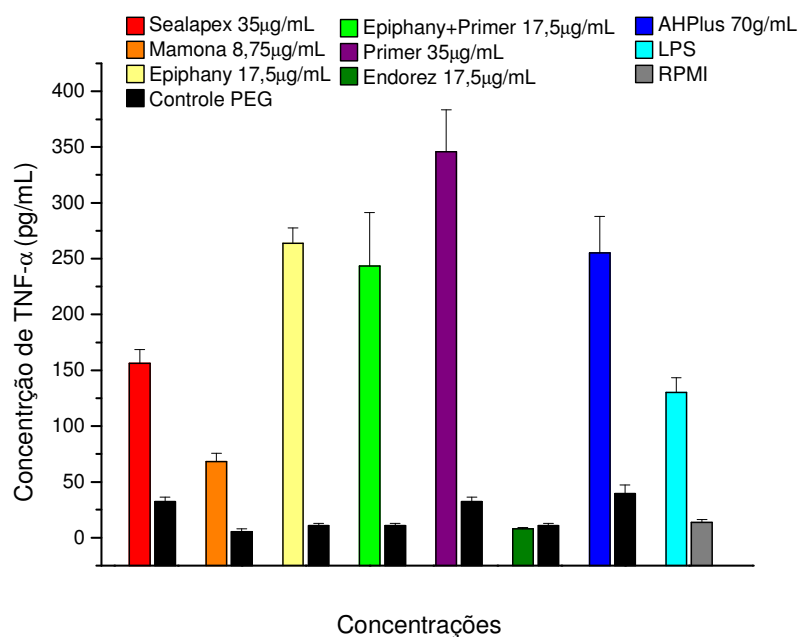


FIGURA 17 - Produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss machos em presença de diferentes cimentos. Os macrófagos peritoneais foram cultivadas em presença do Sealapex, Polímero de Mamona, do Epiphany, do Epiphany+Primer, do Primer, do EndoRez, do AH Plus e do LPS, como controle positivo, nas concentrações de 35 μ g/ml, 8,75 μ g/ml, 17,5 μ g/ml, 17,5 μ g/ml, 35 μ g/ml, 17,5 μ g/ml, 70 μ g/ml e 10 μ g/ml, respectivamente, ou somente meio RPMI contendo 0,19%, 0,05%, 0,10%, 0,10%, 0,19%, 0,10%, 0,38% e 0% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de TNF- α foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de TNF- α recombinante e os resultados expressos em pg/ml, como média \pm desvio padrão.

Tabela 17 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de TNF- α (em pg/ml) em presença de diferentes cimentos e LPS

Produção de TNF- α (pg/ml) – Cimentos				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
Sealapex 35 μ g/ml	6	156,224	12,551	5,124
0,19% PEG	4	32,478	3,898	1,949
Mamona 8,75 μ g/ml	6	68,140	7,685	3,137
0,05% PEG	3	5,627	2,451	1,415
Epiphany 17,5 μ g/ml	6	263,699	13,951	5,695
0,10% PEG	5	10,668	2,249	1,006
Epiphany+Primer 17,5 μ g/ml	6	243,334	48,098	19,636
0,10% PEG	5	10,668	2,249	1,006
Primer 35 μ g/ml	6	345,860	37,442	15,286
0,19% PEG	4	32,478	3,898	1,949
EndoRez 17,5 μ g/ml	6	8,200	0,949	0,387
0,10% PEG	5	10,668	2,249	1,006
AH Plus 70 μ g/ml	6	254,971	32,890	13,427
0,38% PEG	5	39,424	7,839	3,506
LPS	6	130,220	13,229	5,401
RPMI	6	13,748	2,501	1,021

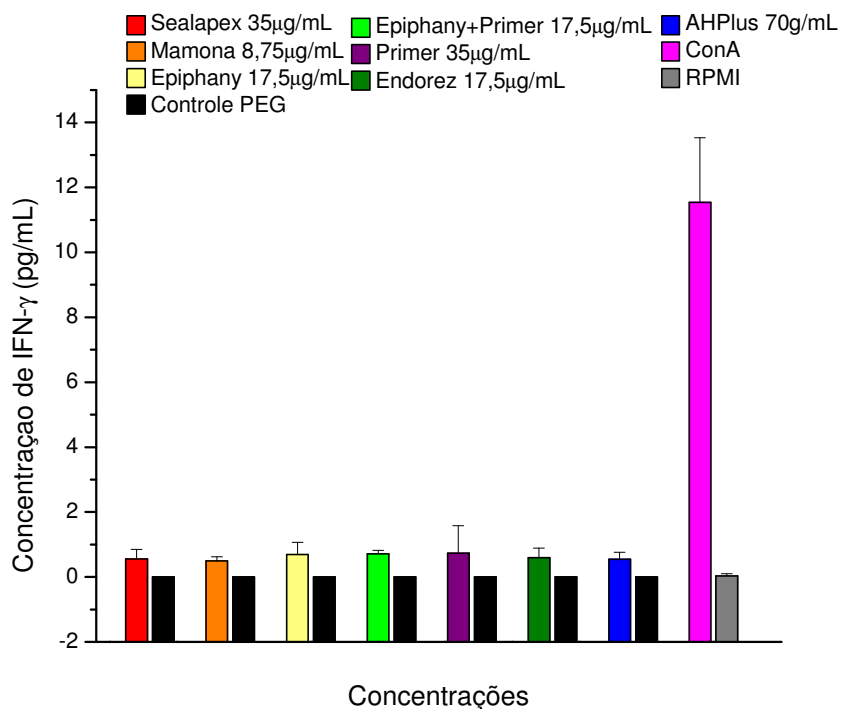


FIGURA 18 - Produção de interferom gama (IFN- γ) por células esplênicas de camundongos Swiss machos em presença de diferentes cimentos. As células esplênicas foram cultivadas em presença do Sealapex, do Polímero de Mamona, do Epiphany, do Epiphany + Primer, do Primer, do EndoRez, do AH Plus e da ConA, como controle positivo, nas concentrações de 35 $\mu\text{g/ml}$, 8,75 $\mu\text{g/ml}$, 17,5 $\mu\text{g/ml}$, 17,5 $\mu\text{g/ml}$, 35 $\mu\text{g/ml}$, 17,5 $\mu\text{g/ml}$, 70 $\mu\text{g/ml}$ e 0,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, ou somente meio RPMI contendo 0,19%, 0,05%, 0,10%, 0,10%, 0,19%, 0,10%, 0,38% e 0% de PEG, respectivamente, como controle. As concentrações de IFN- γ foram determinadas através de uma reta padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de IFN- γ recombinante e os resultados expressos em pg/ml, como média \pm desvio padrão.

Tabela 18 - Médias, desvio padrão e erro médio dos valores de liberação de IFN- γ (em pg/ml) em presença de diferentes cimentos e LPS

Produção de IFN- γ (pg/ml) – Cimentos				
Testes	Pontos	Média	Desvio Padrão	Erro Médio
Sealapex 35 μ g/ml	6	0,555	0,295	0,120
0,19% PEG	6	0	0	0
Mamona 8,75 μ g/ml	6	0,494	0,129	0,053
0,05% PEG	6	0	0	0
Epiphany 17,5 μ g/ml	6	0,696	0,371	0,152
0,10% PEG	6	0	0	0
Epiphany+Primer 17,5 μ g/ml	6	0,708	0,116	0,047
0,10% PEG	6	0	0	0
Primer 35 μ g/ml	6	0,730	0,850	0,347
0,19% PEG	6	0	0	0
EndoRez 17,5 μ g/ml	6	0,590	0,303	0,124
0,10% PEG	6	0	0	0
AHPlus 70 μ g/ml	6	0,543	0,220	0,090
0,38% PEG	6	0	0	0
ConA	6	11,535	1,998	0,816
RPMI	6	0,028	0,069	0,028

Discussão

Considerando que a terapia endodôntica é uma microcirurgia desenvolvida por etapas clínicas interligadas e interdependentes, cada etapa merece conhecimento aprimorado dos aspectos biológicos, pois técnicas e materiais apropriados, que respeitam os tecidos dentários e paradentários, favorecem a obtenção do sucesso no tratamento endodôntico.

Dentre as fases ou etapas clínicas do tratamento de canais radiculares, a obturação é aquela que representa o reflexo dos predicados técnicos do profissional, da excelência dos materiais utilizados e comprovam a eficácia das fases clínicas previamente realizadas. A obturação do sistema de canais radiculares também merece ênfase especial, porque substitui a polpa radicular e reflete a postura do profissional em relação à terapia endodôntica.

Os materiais obturadores de canais radiculares devem preencher requisitos adequados de propriedades biológicas e físico-químicas. Dentre as propriedades físico-químicas, esses materiais devem selar hermeticamente e tridimensionalmente o canal radicular modelado, proporcionar tempo adequado de trabalho, possuir fluidez que permita inserção, radiopacidade diferente da dentina, adesão aos cones de guta-percha, silicone ou resina e dentina, escoamento, solubilidade compatível com a velocidade da fagocitose e pequeno ou nulo índice de contração pós-presão ou polimerização. Quanto às propriedades biológicas dos materiais obturadores, deve-se ressaltar que esses materiais ficarão em contato permanente com os tecidos do sistema de canais radiculares (se houverem), e das regiões apical e periapical e deverão oferecer e proporcionar tolerância tecidual com selamento e/ou isolamento com tecido mineral ou fibras.

A reação orgânica de reparo é dependente, além de outros fatores, da composição dos materiais utilizados. Desde que esses materiais estejam em contato direto com o tecido conjuntivo (apical, periapical, do sistema de canais radiculares) é imperiosa sua baixa citotoxicidade e biocompatibilidade. Os materiais obturadores de canais radiculares existentes no mercado são classificados como sólidos ou plásticos. Os sólidos são geralmente cones à base de guta-percha/óxido, silicone, resina, óxido de zinco ou prata.

Devido, principalmente, a oxidação e corrosão, os materiais sólidos à base de prata foram banidos do uso em Endodontia. Já os materiais sólidos a base de guta-percha, óxido de zinco, resina ou silicone constituem-se em escolha da maioria dos endodontistas, uma vez que têm seu uso consagrado clínica, radiográfica e microscopicamente. Por serem sólidos, esses materiais usados em forma de cone, não podem ser utilizados sem um coadjuvante plástico, uma vez que propriedades físico-químicas como infiltração marginal e selamento hermético não são atendidas adequadamente.

Os materiais plásticos são classificados de acordo com a sua composição, e geralmente são à base de óxido de zinco e eugenol, à base de hidróxido de cálcio, resinas epóxicas ou compômeros.

Da Metodologia

Hoje em dia, apesar dos diferentes níveis de pesquisa utilizados em Endodontia, como por exemplo, os testes primários (hematogênicos e de cultura celular), secundários (implantes em subcutâneo de ratos, camundongos) e tradicionais clínico/microscópicos (dentes de gatos, cães, macacos e humanos); maior importância é dada aos testes tradicionais¹⁸⁰. A facilidade em se comparar os resultados microscópicos da região pulpar e periapical de dentes de cães e macacos, com os resultados clínicos em humanos, obscurece as análises centradas no entendimento de micro estruturas celulares e de seus componentes. No entanto, grandes são as objeções quanto ao uso desses animais (cães e macacos) devido o alto custo e restrições das sociedades protetoras de animais^{62,119}

Para se avaliar a biocompatibilidade^{91,125,182} de materiais obturadores, basta permitir o contato desses materiais com o tecido conjuntivo apical/periapical. A partir do conhecimento dos fenômenos inflamatórios, infecciosos e de reparo, extrapola-se tais constatações para as observações clínicas, criando um modelo de estudo e avaliação.^{44,153,180}

Apesar do alto custo e das restrições, esse modelo é bastante utilizado e já se consagrou, criando, inclusive, diferenciações para “status” de vitalidade pulpar e necrose

pulpar com ou sem sugestão radiográfica de lesão periapical. Tal modelo atinge tanta fidedignidade, que já é possível se criar modelos com específica microbiota. A facilidade de reprodutibilidade, no entanto, tem levado a maioria dos pesquisadores a realizar controle de qualidade de diferentes materiais e técnicas, ao invés de se criar novos materiais e aprimoramento dos já existentes.^{79,87,150}

É comum a análise comparativa de diferentes materiais obturadores utilizando esse nível de pesquisa.^{2,19,88} Como a indústria dificilmente divulga, com precisão, a composição de tais materiais, o pesquisador deixa de lado seu âmago investigativo e passa a comparar distintos materiais, elegendo aquele que melhor se comporta na região periapical e apical decorrido certo período de tempo.^{128,136}

Quando começou a restrição ao uso de animais (cães e macacos)^{49,62,119} para investigação em odontologia nos anos 90,^{42,49} passou-se a atentar para níveis menos complexos de avaliação, com maior controle sobre os fatores experimentais e menor número de variáveis. Constatou-se como é difícil ser simples e a partir da análise de um grupo celular, extrapolar e somar resultados para o melhor entendimento da biocompatibilidade e, principalmente, de um subconjunto dessa, a citotoxicidade.^{5,7,10,13,22,143} Nesse nível de pesquisa (cultura de células), os primeiros elementos que foram avaliados utilizavam culturas de células HeLa¹²³ e as conseqüentes absorções de Cr⁸⁶, alterações morfológicas, seguindo o conceito de tumefação turva, condensação cromatínica, cariorrexe e cariólise, proliferação e interrupção do processo mitótico.^{10,146} Seguindo o conceito de análise e conhecimento dos processos de agressão celular,³⁷ iniciou-se a interpretação de como alguns materiais odontológicos se comportaram em relação ao contato direto e/ou indireto com as culturas de células HeLa.^{152,153} É importante ressaltar as evoluções obtidas, neste contexto, a partir das realizações de Spangberg¹⁵³, principalmente sobre como se estocar, cultivar e manter vivas essas células, os meios para a sobrevivência e, principalmente, a não interação negativa com as células, estressando-as. As células HeLa, porém, apresentavam alguns inconvenientes do ponto de vista da fidedignidade ou proximidade da situação celular real e de normalidade. Tais células são provenientes de tumor maligno, onde as células têm a

tendência natural de se multiplicar e assumir uma morfologia próxima do estágio embrionário³⁷. Esse “status quo” não é o mesmo da fisiologia normal da região apical e periapical; apesar disso, a partir da análise das reações já mencionadas, desse grupo celular, iniciou-se o entendimento da complexidade das reações aí presentes⁹⁸.

Aprimorando-se esse modelo iniciou-se, na década de 90, o uso de fibroblastos da região subcutânea, conjuntiva de ratos e camundongos e pulpar de cães e humanos^{3,7,70,91}. Logicamente, esse modelo é muito mais fidedigno que o das células HeLa. Dentre as populações residentes no tecido conjuntivo apico/periapical, destaca-se o grupo celular fibroblástico.^{106,139}

O contato de materiais obturadores (corpos estranhos)¹³⁴ com esse grupo celular promove a alteração morfológica, mudança no metabolismo, com variação para mais ou para menos na síntese colagênica, citodiferenciação, ativação mitótica, apoptose acelerada ou retardada e liberação de citocinas e/ou fatores de crescimento e/ou citodiferenciação⁹¹. Esse modelo, muito mais complexo, permitiu analisar vários parâmetros diferentes de comportamento e, a partir daí, possibilitar interpretações que, coadjuvadas da análise das células HeLa, permitiram um melhor entendimento e compreensão do que é citotoxicidade^{5,7,10,13,23,125} e, conseqüentemente, biocompatibilidade^{91,123}. Esses estudos, nesse nível de pesquisa, serviram como um “turning point”, no modelo a ser utilizado para analisar o comportamento biológico dos materiais obturadores¹⁵³. Esse modelo, já no fim dos anos 90, passou a predominar^{6,42} por ser mais barato, de fácil obtenção, rápido por utilizar animais inferiores (ratos e camundongos) e trazendo informações compatíveis com o comportamento biológico. Basicamente, o que houve foi uma mudança radical na concepção do que é pesquisa em Endodontia.

Ao invés de se pensar macroscopicamente, ou quando muito analisando microscopicamente um tecido; o que agora ocorre é uma introspecção no âmago do tecido, diferenciando grupos celulares, as reações que cada grupo efetua, a relação e inter-relação entre esses grupos e suas implicações no processo infeccioso, inflamatório e de reparo^{37,42,143}

Nesse estudo, avaliou-se o comportamento biológico a partir do contato do material obturador com células inflamatórias mononucleadas.^{6,13,18,34,42}

Todo material obturador de canais radiculares, seja ele sólido ou plástico, é um corpo estranho ao organismo.

Após a obturação do canal radicular, ocorre o contato do material obturador, com o tecido conjuntivo apical. Em se tratando de um dente que apresenta vitalidade pulpar, esse tecido conjuntivo está, normalmente, isento de infecção, e com inflamação de suave a moderada, devido às alterações pulpares. Predominam aí fibroblastos e células inflamatórias polimorfonucleadas e mononucleadas³⁷. Após os passos operatórios próprios dessa terapia e obturando-se o canal radicular, após alguns dias a perpetuação desse contato, dependerá das condições intrínsecas do material e das reações provenientes desse contato. A célula que coordena essas reações funciona como um maestro coordenando as ações da orquestra (ou seja, de todo o tecido, reação de Schwartzman) é o macrófago.^{37,139}

Quando se obtura o canal radicular de um dente que apresenta necrose/gangrena pulpar, geralmente, o tecido que está presente no periápice tem predominância de células polimorfonucleadas nos processos agudos, e monoculeadas, típicas de tecido granulomatoso, nos processos crônicos.³⁷

Em ambas as situações, após a obturação, ocorre a mudança no “status quo” desses tecidos inflamados aguda ou cronicamente, para tecido de granulação, onde predominam os macrófagos, que aí também regem o processo de reparo⁹¹. É portanto, o macrófago, a célula de maior importância para o entendimento das reações que ocorrem pós-obturaçã¹⁸⁶. O material obturador substitui de maneira anômala a realidade do tecido pulpar. É para o organismo um corpo estranho. O reconhecimento dessa “estranheza” é feito pelo complexo maior de histocompatibilidade, presente nos linfócitos T e macrófagos.¹³⁹ A partir desse reconhecimento, o macrófago inicia a fagocitose ou a tentativa de fagocitose desse corpo estranho.^{37,139}

Quando esse material é o cone de guta-percha, silicone ou resina e estando o mesmo em contato com o tecido conjuntivo apical e periapical, desencadeia-se várias reações orgânicas. A primeira é o seu reconhecimento por macrófagos e linfócitos como corpo estranho com subsequente fagocitose. Devido à estrutura lisa e pouca solubilidade, os macrófagos, após reconhecimento, iniciam a fagocitose, que não chega a termo, especificamente por essas características físicas. Dá-se dessa maneira, o que se denomina fagocitose incompleta. Na tentativa de se fagocitar elementos com essas características, o macrófago lança no meio celular varias citocinas e derivados do nitrogênio, o óxido nítrico (NO), através da regurgitação durante a fagocitose ou excitação da membrana citoplasmática. O NO (óxido nítrico) além de ser um elemento liberado pelo contato dos macrófagos com o material obturador, através da excitação da membrana celular, é um gás solúvel de radical livre conhecido até bem pouco tempo como poluente da atmosfera. Além dos macrófagos, ele também é produzido por células endoteliais e neurônios centrais específicos. É sintetizado a partir da L-arginina, uma enzima cálcio dependente, do oxigênio molecular e do NADPH pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Existem dois tipos de NO. Nas células endoteliais e nos neurônios, o NO está presente constitutivamente e pode ser rapidamente ativado por aumento de íons de cálcio citoplasmáticos na presença de calmodulina. A entrada de cálcio nestas células induz a uma rápida produção de NO. Em contraste, o NO macrofágico é produzido quando os macrófagos são ativados por citocinas (ex., TNF- α , IFN- γ) ou por outros agentes (ex., LPS bacteriano), não sendo necessário haver o aumento de cálcio intracelular. Uma vez que a meia vida do NO in vivo é muito curta, o gás só atua em células muito próximas do local onde é produzido. Esta atividade explica a especificidade de suas ações. Além de promover o relaxamento da musculatura, destacam-se outras importantes funções como:

- a. reduz a agregação plaquetária;
- b. o NO produzido pelos macrófagos, atua como radical livre, sendo citotóxico para determinados microrganismos e células tumorais;
- c. oxida grupamentos sulfidrilas nas proteínas e causa a depleção de glutatião citossólico;
- d. reage com o ânion superóxido e forma o poderoso oxidante dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila.

Assim como o H_2O_2 e o TNF, quanto mais liberado no meio, é indicativo de maior citotoxicidade do material em contato.

Quando o material obturador é um cimento endodôntico, devido as características físicas, intrínsecas principalmente a solubilidade, ocorre a fagocitose desses elementos, liberando-se no meio celular outras citocinas e também os derivados do oxigênio e nitrogênio.

Dependendo das características intrínsecas de cada material obturador, durante a fagocitose ocorre a “liberação” de citocinas como, por exemplo, interleucinas e fatores de crescimento^{102,125} que, ao interagirem com os fibroblastos, induzem a citodiferenciação e alteração metabólica que levam à produção de matriz mineralizada ou fibras colágenas¹³⁴ que terminam isolando o material obturador do tecido conjuntivo, impedindo o contato com macrófagos e a conseqüente reação corpo estranho/conjuntivo.^{91,131}

Esse isolamento permite a perpetuação desse material ao nível foraminal, conferindo biocompatibilidade.^{125,182}

Citocinas são mediadores químicos solúveis sintetizados e liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário e desempenham papel importante na comunicação intercelular e em processos fisiopatológicos. São responsáveis pela modulação da inflamação, reparo e imunidade, regulando o crescimento e citodiferenciação de leucócitos e células não leucocitárias. Tais citocinas, provenientes da fagocitose de materiais obturadores e derivados do oxigênio e nitrogênio, geralmente o fator de necrose tumoral (TNF), e previamente o NO, interferon (IFN), fator de crescimento epitelial (EGF), interleucinas (IL), fatores estimuladores de colônia (CSF), atuam pela ligação a receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata de eventos que levam à indução, ao favorecimento ou à inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo celular. Especificamente para esta investigação, analisou-se a liberação de TNF- α e IFN- γ que possuem efeito estimulante na liberação de NO, apresentam atividade citotóxica pela

indução dos reagentes intermediários do oxigênio (H_2O_2), não apenas nos macrófagos e polimorfonucleadas, mas também em células cancerígenas, é quimiotático para neutrófilos, adjuvante na proliferação e citodiferenciação de células β humanas, interferindo no processo de citodiferenciação, proliferação celular e atua em sinergia com a interleucina-1 (IL-1), na ativação osteoclástica, associados à liberação de prostaglandina- E_2 .

O NO, quando liberado em grandes quantidades, pode ter efeito deletério ao meio, com aumento do metabolismo celular e perpetuação do processo inflamatório. Já em pequenas quantidades, possui efeitos que favorecem o processo de isolamento do corpo estranho, induzindo a citodiferenciando de fibroblastos, exacerbando a síntese protéica e colagênica, o que caracteriza reparo pós-obturaçãõ com formação de cápsula fibrosa ou de tecido mineralizado, que impede o contato de células leucocitárias com o corpo- estranho.

O óxido nítrico tem íntima relação com o processo inflamatório e sua magnitude^{110,121,168}. O processo inflamatório é um fenômeno basicamente vascular, quanto maior a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, maior a quantidade de células inflamatórias e derivados que perpetuam a inflamação, presente no tecido conjuntivo.^{37,75,110}

O NO intermedeia as reações de relaxamento e constricção vascular¹²¹. Liberado em grandes quantidades potencializa o processo inflamatório¹⁶⁸. Além da ação relaxante vascular, o NO inibe a agregação plaquetária e é citoprotetor, sendo liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano, juntamente com O_2^- e H_2O_2 .¹²⁹

Outro fator importante a considerar, é a concentração do material obturador em contato com a cultura de macrófagos.

A pesar de alguns trabalhos utilizarem concentrações pré-estabelecidas, é imperioso que antes de se analisar a liberação de mediadores, verifique-se qual a concentração ideal de cimento a ser utilizado. Para isso, o teste do MTT deve ser considerado. Assim, para cada material obturador, primeiro se determinam a concentração viável, e a partir desse

dado, são determinadas as liberações de NO e TNF- α em cultura de macrófagos e IFN- γ em cultura de células esplênicas.

Dos Resultados

Parâmetros como produção de Óxido Nítrico (NO), produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) ou produção de Interferon Gama (IFN- γ) por parte de células, são bastante utilizados na Imunologia e na avaliação da citotoxicidade de fármacos. No entanto, a detecção da liberação desses mediadores celulares pode nos fornecer uma idéia de sua biocompatibilidade ou ausência de citotoxicidade apresentada por determinado material, principalmente tratando-se de cimentos endodônticos, pois, muitas vezes, a citotoxicidade de um determinado material é tanta que pode levar grande parte das células em contato com esse à necrose (Leonardo⁹¹, em 1991).

Assim, a ausência de um número representativo de células viáveis irá nos oferecer índices nulos ou bastante baixos de liberação de tais mediadores celulares. Daí, a importância de determinarmos a menor diluição deste material garantindo um número adequado de células viáveis para uma resposta adequada frente ao material em estudo no ensaio *in vitro*.

Além do MTT já utilizado na Endodontia (Camps, About³¹, 2003; Huang et al.⁶⁵, 2004; Bouillaguet et al.²⁵, 2006), existem outros testes de viabilidade celular, bastante difundidos na Imunologia atual como da Fluorimetria (Virag et al.¹⁷⁸, 1995; Arai et al.⁴, 2002; Leira et al.⁸⁵, 2002) e do Vermelho Neutro (Babich, Tipton⁹, 2002; Lovschall et al.⁹³, 2002; Nakamura et al.¹¹², 2004; Jörg et al.⁶⁹, 2005; Fotakis, Timbrell⁴⁵, 2006). Na Odontologia recente podemos destacar como testes de viabilidade celular o Nigrosin (Miletić et al.¹⁰⁴ em 2005), e o Tetrazolium Azul empregado por Merdad et al.¹⁰⁰ em 2007. No presente estudo, foi adotado o teste do MTT, sendo avaliados os cimentos endodônticos Sealapex, Polímero de Mamona, Epiphany, EndoRez e AH Plus.

O MTT (3-(4,5-dimethylthiozilato-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), desenvolvido por Mosmann¹¹¹ em 1983, é um sal que é utilizado como ensaio quantitativo colorimétrico para determinar a proliferação e viabilidade celular. Desse modo, os resultados do referido teste, para os diferentes cimentos endodônticos em contato com o macrófago ou célula esplênica, mostraram a presença de no mínimo 80% de células viáveis com diferentes diluições. O cimento que necessitou de maior diluição (polímero de mamona = 8,75µg/ml) é seguramente mais citotóxico do que os outros aqui testados (Figura 15).

Polímero de Mamona

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo Polímero da Mamona nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml e 8,75 µg/ml, bem como a quantidade de NO liberado nos sobrenadantes destas culturas celulares. Os resultados estão representados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Quando cultivadas na presença do Polímero de Mamona, observou-se baixa viabilidade das células do exsudato peritoneal quando cultivadas na presença deste cimento nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, com diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com os seus respectivos controles ($p < 0,001$). Como demonstrado na Figura 3 e Tabela 3, observou-se elevada viabilidade celular quando as células foram desafiadas com o polímero da mamona na concentração de 8,75 µg/ml.

Quanto à produção de NO (Figura 4 e Tabela 4) observou-se maior produção quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com o Polímero da Mamona na concentração de 8,75 µg/ml, com diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,001$, quando comparadas às demais concentrações testadas deste cimento.

Juntos, estes resultados demonstram que a concentração mais adequada do Polímero da Mamona a ser utilizada nos testes biológicos é de 8,75 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada a maior resposta ao estímulo, avaliado pela produção de NO.

Sealapex

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo Sealapex nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, bem como a quantidade de NO liberado nos sobrenadantes destas culturas celulares.

Na Figura 1 e Tabela 1, demonstram uma elevada viabilidade das células do exsudato peritoneal quando cultivadas em presença das diferentes concentrações de Sealapex, não mostrando diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com a viabilidade celular de seu respectivo controle ($p > 0,05$).

Quanto à produção de NO (Figura 2 e Tabela 2) observou-se maior produção quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com o Sealapex na concentração de 35 µg/ml, com diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,001$, quando comparadas às demais concentrações testadas deste cimento.

Juntos, estes resultados demonstram que a concentração mais adequada de Sealapex a ser utilizada neste teste é a de 35 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada à maior resposta ao estímulo, avaliado pela produção de NO.

Epiphany

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo Epiphany nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, bem como a quantidade de NO liberado nos sobrenadantes destas culturas celulares. Os resultados estão representados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

Quando cultivadas na presença do Epiphany, observou-se baixa viabilidade das células do exsudato peritoneal quando cultivadas na presença deste cimento na concentração de 281 µg/ml e 140 µg/ml, com diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o seu respectivo controle ($p < 0,001$). Quando desafiadas com o cimento na concentração de 70 µg/ml, observou-se diferença estatisticamente significativa quando comparada ao seu controle, sendo $p < 0,01$ (Figura 5 e Tabela 5). Em presença de concentrações menores de Epyphani (35 µg/ml e 17,5 µg/ml) observou-se maior viabilidade celular, sem diferença significativa de seu controle ($p > 0,05$).

Quanto à produção de NO (Figura 6 e Tabela 6) observou-se maior produção quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com o Epiphany na concentração de 17,5 µg/ml, com diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,001$, quando comparadas às demais concentrações testadas, deste cimento.

Analisando-se estes resultados observa-se que a concentração mais adequada do Epiphany a ser utilizada neste teste é a de 17,5 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada à maior resposta ao estímulo, avaliada pela produção de NO.

Epiphany + Primer

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo Epiphany + Primer nas concentrações 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, bem como a quantidade de NO liberada nos sobrenadantes destas culturas celulares. Os resultados estão representados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Quando cultivadas na presença do Epiphany + Primer, observou-se que a viabilidade das células do exsudato peritoneal quando cultivadas na presença deste cimento nas concentrações 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, é inversamente proporcional a concentração do cimento. Nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml e 35 µg/ml observou-se diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com seus respectivos controles ($p < 0,001$) (Figura 7 e Tabela 7). Por outro lado não se observou diferença estatisticamente diferente quando comparou-se a viabilidade celular testada frente à concentração de 17,5 µg/ml e o controle contendo polietilenoglicol ($p > 0,05$).

Quanto à produção de NO (Figura 8 e Tabela 8) observou-se maior produção de NO quando se utilizou a concentração 17,5 µg/ml comparada ao seu controle ($p < 0,001$). Juntos estes resultados demonstram que a concentração mais adequada do Epiphany + Primer a ser utilizada neste teste é a de 17,5 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada à maior resposta ao estímulo, avaliada pela produção de NO.

Primer

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo Primer nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml, bem como a quantidade de NO liberada nos sobrenadantes destas culturas celulares. Os resultados estão representados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Quando cultivadas na presença do Primer, observou-se elevada viabilidade das células do exsudato peritoneal quando cultivadas na presença deste cimento nas diversas concentrações, com diferenças não estatisticamente significativas quando comparadas com os seus respectivos controles ($p>0,05$) (Figura 9 e Tabela 9).

Quanto à produção de NO (Figura 10 e Tabela 10) observou-se maior produção quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com o Primer na concentração de 35 µg/ml, com diferenças estatisticamente significativas, com $p<0,001$, quando comparadas as demais concentrações testadas.

Juntos estes resultados demonstram que a concentração mais adequada do Primer a ser utilizada neste teste é a de 35 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada à maior resposta ao estímulo, avaliada pela produção de NO.

EndoRez

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo EndoRez nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml e 17,5 µg/ml⁵, bem como a quantidade de NO liberada nos sobrenadantes destas culturas celulares. Os resultados estão representados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Quando cultivadas na presença do EndoRez, observou-se maior viabilidade das células do exsudato peritoneal quanto menor a concentração do cimento, entretanto, todas as concentrações demonstraram valores estatisticamente significativos, com $p < 0,01$, quando comparados com o seu respectivo controle. Quando se comparou a viabilidade das células desafiadas com o cimento na concentração de 281 µg/ml, que produziu menor viabilidade, com a de 17,5 µg/ml, que produziu maior viabilidade, observou-se valores estatisticamente significativos, sendo $p < 0,001$ (Figura 11 e Tabela 11).

Quanto à liberação de NO (Figura 12 e Tabela 12) observou-se produção crescente de NO conforme as células foram tratadas com concentrações menores do EndoRez. Quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com o EndoRez na concentração de 17,5 µg/ml, observou-se o mais alto nível de liberação de NO, com diferenças estatisticamente significativas, com $p < 0,001$, quando comparadas às demais concentrações testadas deste cimento.

Juntos, estes resultados demonstram que a concentração mais adequada do EndoRez a ser utilizada neste teste é a de 17,5 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada à maior resposta ao estímulo, avaliada pela produção de NO.

AH Plus

Avaliou-se a viabilidade das células do exsudato peritoneal dos camundongos Swiss machos mantidos em cultura de 24 horas em meio RPMI-1640-C contendo AH Plus nas concentrações de 281 µg/ml, 140 µg/ml, 70 µg/ml, 35 µg/ml, 17,5 µg/ml bem como a quantidade de NO liberado nos sobrenadantes destas culturas celulares. Os resultados estão representados nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

Quando cultivadas na presença do AH Plus, observou-se baixa viabilidade das células do exsudato peritoneal quando cultivadas na presença deste cimento na concentração de 281 µg/ml, 140 µg/ml e 70 µg/ml com diferença estatisticamente significativa quando comparada com os seus respectivos controles ($p < 0,001$). Em presença de uma concentração menor de (35 µg/ml) observamos maior viabilidade celular, com diferença não significativa de seus respectivos controles ($p > 0,05$). Quando desafiadas com a concentração 17,5 µg/ml do cimento a diferença entre o grupo tratado e seu controle foi estatisticamente significativa, com $p < 0,001$ (Figura 13 e Tabela 13).

Quanto à produção de NO (Figura 14 e Tabela 14) observou-se maior produção quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com o AH Plus na concentração de 70 µg/ml, com diferença estatisticamente significativa com $p < 0,001$ quando comparadas às demais concentrações testadas deste cimento.

Juntos, estes resultados demonstram que a concentração mais adequada do AH Plus a ser utilizada neste teste é a de 70 µg/ml, na qual se observou elevada viabilidade celular associada à maior resposta ao estímulo, avaliada pela produção de NO.

Os materiais Sealapex e Primer do cimento Epiphany foram menos diluídos (diluição de 281 µg/ml) fornecendo mais de 80% de células viáveis. Todos os demais cimentos necessitaram de maiores diluições (menores concentrações) para se alcançar tal concentração de células viáveis: o Epiphany com 70 µg/ml, AH Plus com 35 µg/ml, Polímero de Mamona e o Epiphany+Primer ambos com 8,75 µg/ml e por último o cimento

EndoRez que não atingiu o índice de 80% de células viáveis em nenhuma das diluições testadas.

Os resultados apresentados neste estudo com relação ao Sealapex vão de encontro à maioria dos trabalhos encontrados na literatura, dos quais podemos destacar os de Holland, Souza⁶¹ (1985); Bonetti Filho²³ (1990); Silva¹⁴⁹ em 1995, que demonstraram em outros níveis de pesquisa biológica, resultados bastante satisfatórios, determinados inclusive pelo fechamento do forame apical de dentes de cães, pela deposição de tecido mineralizado, bastante conhecido como selamento biológico do canal radicular. Esses resultados também foram encontrados em casos de necrose pulpar, acompanhada de reação periapical crônica, mesmo onde houve extravasamento desse cimento para a região periapical (Berbert et al.¹⁵ 2002).

Um outro ponto a observar é que o Sealapex pelo seu pH alcalino e óxido de cálcio de sua composição determina uma necrose superficial em contato com o tecido, mas, de acordo com os trabalhos biológicos já mencionados, esta necrose leva à indução de tecido mineralizado, determinando uma resposta biológica favorável. No entanto, neste nível de pesquisa, cultura de células, esta agressividade inicial do Sealapex, muitas vezes pode induzir respostas desfavoráveis em termos de citotoxicidade, podendo explicar os resultados encontrados por Camps, About³¹ (2003) e Huang et al.⁶⁵ (2004).

Empregando o teste do MTT (Camps, About³¹ em 2003; Öztan et al.¹²⁰, 2003; Huang et al.⁶⁵, 2004), encontraram melhores resultados por parte do cimento AH Plus com relação ao Sealapex. Vale ressaltar que em ambos os trabalhos, as células utilizadas não foram células típicas do sistema imune como os macrófagos aqui empregados já que esses exercem papel fundamental no processo inflamatório, mas sim fibroblastos L929 e células cancerígenas de carcinoma cervical humano (OC2).

Outros trabalhos como os de Miletic et al.¹⁰³, 2000; Pizzo et al.¹³² em 2006; também vislumbraram determinada citotoxicidade por parte do cimento AH Plus corroborando com nossos achados.

É evidente a dificuldade de se dimensionar até que ponto pode-se extrapolar estes achados para uma situação clínica, onde o contato do cimento endodôntico com os tecidos periapicais ocorre mediante uma série de variáveis tais como pH, quantidade de cimento, entre outros.

Determinação da Produção de Óxido Nítrico

Uma vez estabelecidas as concentrações ideais de cada cimento a ser testada nos demais testes biológicos, foi feita a dosagem do óxido nítrico liberado nos sobrenadantes das culturas celulares em presença dos cimentos, do LPS (como controle positivo) ou somente meio RPMI-1640-C contendo ou não PEG (como controle de células), através da reação de Griess (Green et al.⁵⁶ 1982). Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 15 e 16, respectivamente viabilidade celular e produção de óxido nítrico.

Observou-se elevada viabilidade das células do exsudato peritoneal quando estas foram cultivadas na presença dos diferentes cimentos nas concentrações previamente estabelecidas (Figura 15 e Tabela 15), sem diferenças estatisticamente significativas quando se comparou a viabilidade das células cultivadas em presença do Sealapex, Polímero da Mamona, Epiphany, Epiphany + Primer, Primer, EndoRez e LPS, com $p > 0,05$. Houve apenas diferença estatisticamente significativa quando se comparou a produção de NO estimulada pelo AH Plus, em relação aos outros cimentos e ao LPS, com $p < 0,01$ quando comparado ao EndoRez e $p < 0,001$ quando comparado com os demais cimentos e LPS. Embora, quando cultivadas em presença do AH Plus, tenha se verificado menor viabilidade celular, estatisticamente significativa quando comparada com o seu respectivo controle, sendo $p < 0,001$, nesta concentração observou-se maior produção de óxido nítrico.

Quando as células do exsudato peritoneal foram estimuladas com os diferentes cimentos verificou-se elevada liberação de óxido nítrico quando comparadas aos seus respectivos controles (Figura 16 e Tabela 16), com diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,001$, exceto para o Polímero de Mamona, cuja produção de NO, quando comparada com o seu respectivo controle, apresentou diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$.

Quando comparamos a produção de NO estimulada pela presença dos cimentos no meio de cultura com a produção estimulada pelo LPS, observamos que o Primer foi o único material capaz de estimular maior produção de NO, sendo $p < 0,05$. Os cimentos Epiphany + Primer, Polímero de Mamona e Sealapex induziram menor produção de NO que o LPS,

com $p < 0,001$ para os dois primeiros e $p < 0,05$ para o Sealapex comparado com o LPS. Os demais cimentos testados (EndoRez, Epiphany e AH Plus) induziram a uma produção de NO não significativa quando comparada ao LPS ($p > 0,05$). No entanto, todos os cimentos estimularam uma produção de NO estatisticamente significativa quando comparada à produção de NO pelas células cultivadas na ausência de estímulo, ou seja, somente na presença de meio RPMI-1640-C (sendo $p < 0,001$ em todos os casos).

Determinação da Produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

Utilizando-se as concentrações dos cimentos estabelecidas pelos testes de viabilidade celular e produção de óxido nítrico, obtivemos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss machos para a determinação da produção de TNF- α estimulada por estes cimentos e seus respectivos controles de PEG, LPS (como controle positivo) e somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo). A dosagem de TNF- α liberado nos sobrenadantes das culturas das células aderentes foi feita utilizando um kit imunoenzimático (ELISA) BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados estão ilustrados na Figura 17 e na Tabela 17.

Observaram-se as maiores concentrações de TNF- α quando os macrófagos estavam na presença de Sealapex 35 $\mu\text{g/ml}$, Epiphany 17,5 $\mu\text{g/ml}$, Epiphany + Primer 17,5 $\mu\text{g/ml}$, Primer 35 $\mu\text{g/ml}$ e AH Plus 70 $\mu\text{g/ml}$. Quando as células foram desafiadas com o Polímero de Mamona 8,75 $\mu\text{g/ml}$, observou-se produção de TNF- α significativamente maior que seu controle, $p < 0,01$. Por outro lado, o EndoRez a 17,5 $\mu\text{g/ml}$ não foi capaz de estimular a liberação de TNF- α , sendo seus valores não significativos quando comparados com o seu controle ($p > 0,05$).

Quando se comparou a produção de TNF- α induzida pelo LPS com aquelas estimuladas pelos cimentos, observou-se que o Epiphany, Epiphany + Primer, Primer e AH Plus induziram a uma produção de TNF- α maior que aquela estimulada pelo LPS, com $p < 0,001$. Já o Polímero de Mamona e o EndoRez, ao contrário, induziram a uma produção estatisticamente menor de TNF- α do que o LPS, sendo $p < 0,001$. Quando comparadas ao

controle de células tratadas só com o meio RPMI-1640-C observou-se que somente o EndoRez não estimulou produção de TNF- α significativa (com $p > 0,05$), os demais cimentos estimularam uma produção de NO estatisticamente maiores que o controle de células, sendo $p < 0,01$ em relação ao Polímero de Mamona e $p < 0,001$ em relação aos demais cimentos.

Determinação da Produção de Interferon-gama (IFN- γ)

O ensaio biológico para determinação do nível de IFN- γ foi realizado com células esplênicas onde temos, entre outros componentes, o linfócito T, potente indutor de IFN- γ . Utilizando-se as concentrações dos cimentos estabelecidas pelos testes de viabilidade celular e produção de óxido nítrico, obtivemos sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos Swiss machos para a determinação da produção de IFN- γ estimulada por estes cimentos e seus respectivos controles de PEG, ConA (como controle positivo) e somente meio RPMI-1640-C (como controle negativo). A dosagem de IFN- γ liberado nos sobrenadantes das culturas das células aderentes foi feita utilizando um kit imunoenzimático (ELISA) BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados estão ilustrados na Figura 18 e na Tabela 18.

Observou-se que nenhum dos cimentos induziu a uma produção de IFN- γ estatisticamente significativa quando comparadas com o seu respectivo controle negativo, sendo $p > 0,05$. Quando comparada a produção de IFN- γ induzida pelo controle positivo da reação, a ConA, com a estimulada pelos cimentos, observou-se elevada produção de IFN- γ pelas células estimuladas com a ConA, com $p < 0,001$ quando comparadas a todos os cimentos testados. Na literatura não foram encontrados trabalhos relacionando IFN- γ e cimentos endodônticos.

A secreção de citocinas é um componente importante na resposta imune inata por mediar muitas das suas funções efetoras. O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda e é produzido principalmente por macrófagos ativados (Beutler, Cerami¹⁷, 1986). Atua no início da resposta imune, regula a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória e está envolvido em eventos locais e sistêmicos, contínuos à

inflamação (Markhatadze⁹⁷, 1998). Sua principal função é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção e ativar estas células a erradicar os microorganismos. O TNF- α também atua como um pirogênio endógeno, induzindo febre por aumentar a síntese de prostaglandinas (Beutler¹⁶, 1995).

Existem dados na literatura mostrando que o NO funciona como um modulador na liberação de citocinas e de outros mediadores inflamatórios. Dessa forma, tem sido mostrado que o NO regula a secreção de citocinas pelos macrófagos de uma maneira autócrina ou parácrina. Por outro lado, a indução da transcrição da iNOS está sob controle das citocinas derivadas das células T. Em geral, as citocinas de perfil Th1, especialmente o IFN- γ , TNF- α e IL-2, regulam positivamente a produção de NO, enquanto que as de perfil Th2, como a IL-4 e IL-10, inibem a geração de NO (Taylor-Robinson et al.¹⁶⁶, 1994). Analisando nossos resultados para confirmar a inter-relação das citocinas e NO seriam necessárias determinações de outras citocinas tais como a IL-2.

Conclusão

Os material mais citotóxico foi o Polímero de Mamona, seguido de EndoRez, Epiphany + Primer, Epiphany, Primer do Epiphany = Sealapex e o cimento AH Plus que precisou de uma menor diluição (maior concentração) para oferecer um mínimo de 80% de células viáveis.

A liberação de NO foi maior pelo Primer, seguido de EndoRez, AH Plus, Epiphany, Sealapex, Epiphany + Primer, o Polímero de Mamona foi o que estimulou a menor produção de NO.

A produção de TNF- α foi maior pelo Primer, seguido de Epiphany, AH Plus, Epiphany + Primer, Sealapex e Polímero da Mamona, sendo que o EndoRez não estimulou a produção de TNF- α .

Nenhum dos cimentos testados induziu à liberação de IFN- γ , demonstrando que outros mediadores tais como IL-1 e IL-2 possam estar envolvidos na liberação de NO, observada no presente estudo.

Referências*

1. Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res.* 1995, 74:1057-65.
2. Almeida WA. Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães, após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1997.
3. Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cells changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J Endod.* 1990, 16:129-34.
4. Arai M, Suzuki-Kioke M, Ohtake SI, Ohba H, Tanaka K, Chiba J. Mutual and directional allogeneic cytotoxic reaction of hemocytes in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi* revealed by one-step quantitative fluorimetric assay. *J Zool Sci.* 2002, 19:263-70.
5. Araki K, Suda H, Barbosa SV, Spangberg LSW. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J Endod.* 1993, 10:554-7.
6. Arenholt-Bindslev D, Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *Int Endod J.* 1990, 23:84-91.
7. Arenholt-Bindslev D, Horsted-Bindslev P. A simple model of evaluation relative toxicity of root filling materials in culture of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5:219-26.
8. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF-antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998; 160:403-9.
9. Babich H, Tipton DA. In vitro response of human gingival epithelioid S-G cells to minocycline. *Toxicol in vitro.* 2002; 16:11-21.

* De acordo com o estilo Vancouver.

10. Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 75:357-61.
11. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997; 30:155-9.
12. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* 1994; 15:74-80.
13. Beltes P, Koulaouzidov E, Kotoula V, Kortsaris AH. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumatol.* 1995; 11:245-9.
14. Berbert CCV, Consolaro A. Influência de cimentos endodônticos na migração neutrofílica pelo testes "Skin Window". *Rev Fac Odontol Bauru.* 1994; 2: 81-7.
15. Berbert FLCV, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressing and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 93:184-9.
16. Beutler B. TNF: Immunity and inflammatory disease: lessons of past decade. *J Invest Med.* 1995; 43: 227-34.
17. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature.* 1986; 320: 584-8.
18. Biggs JT, Kaminski EJ, Osetek EM. Rat macrophage response to implanted sealer cements. *J Endod.* 1985; 11: 30-6.
19. Bilginer S, Timuresener I, Söylemezoglu F, Tifitk AM. The investigation of biocompatibility and apical microleakage of tricalcium phosphate based root canal sealers. *J Endod.* 1997; 23: 105-9.
20. Birman EG, Mariano M. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. *Braz J Med Biol Res.* 1985; 18: 507-12.
21. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- γ . *Ann Rev Immunol.* 1997; 15: 749-95.
22. Bonetti Filho I. Avaliação da capacidade seladora de diferentes técnicas de obturação dos canais radiculares através da infiltração do corante Rodamina B à 0,2% [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1986.
23. Bonetti Filho I. Avaliação da biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares. Estudo em dentes de cães [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1990.

24. Bonini S, Mazzer N, Barbieri CH, Lara VS. Resposta inflamatória à poliuretana derivada do óleo de mamona: Estudo da migração e diferenciação de células no sítio inflamatório. *Rev Odonto Ciênc.* 2002; 17: 27-37.
25. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod.* 2006; 32: 989-92.
26. Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112: 182-7.
27. Brennan RE, Russel K, Zhang G, Samuel JE. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulence phase I *Coxiella burnetti* infections. *Infect Immun.* 2004; 72: 6666-75.
28. Burney S, Tamir S, Gal A, Tennenbaum SR. A mechanistic análise od nitric oxide induced cellular toxicity. *Biol Chem.* 1997; 1: 130-44.
29. Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Carvalho LTL. Implante de um floclado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. *Pesqui Odontol Bras.* 2001; 15: 257-62.
30. Camargo WR. Interação dos cimentos Sealapex e CRCS com os macrófagos – estudo morfológico dos efeitos citotóxicos [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 1993.
31. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod.* 2003; 29: 583-6.
32. Canova GC, Taveira LAA, Dezan JrE, Nishiyama CK, Spalding M. Estudo do poder flogógeno de quatro cimentos obturadores de canais radiculares por meio do teste edemogênico. *Rev Facul Odontol Bauru.* 2002; 10:128-33.
33. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 1995; 16: 21-6.
34. Catanzaro-Guimarães SA, Percinoto C. Effect of some endodontic material on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. *J Endod.* 1984; 10:101-4.

35. Cavalieri I, Sá Lima JR, Gomes MF. Estudo do processo de reparação óssea entre os implantes de polímero de mamona, resina acrílica termicamente ativada e cimento ósseo em tíbias de coelhos. *BCI*. 2001; 8: 64-70.
36. Costa CAS, Marcantonio RAC, Hebling J, Teixeira HM, Kuramae M. Biocompatibilidade do polímero de poliuretana vegetal derivada do óleo de mamona em estudo comparativo com cimento de óxido de zinco e eugenol. Avaliação histopatológica de implantes subcutâneos de ratos. *Odonto 2000 Odontol Séc XXI*. 1997; 1: 44-8.
37. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 44-78.
38. Crane DL, Heuer AM, Kamisnki JE, Moser BJ. Biological and physical properties of an experimental root canal sealer without eugenol. *J Endod*. 1980; 6: 438-45.
39. Ding A, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988; 141: 2407-12.
40. Dugas B, Mossalayi DM, Damais C, Kolb JP. Nitric oxide-production by human monocytes/macrophages. Evidence for a role of CD23. *Immunol Today*. 1995; 16: 574-80.
41. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Koluris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod*. 1995; 21: 122-7.
42. Egea SJJ, Rubio-Manzanares AJ. Los macrófagos peritoneales de rata como modelo celular “in vitro” para el estudio de la compatibilidad de los materiales odontológicos. *Operatoria Dental y Endodoncia*. 1998; 2: 1-6.
43. Eriksen HM, Ørstavik D, Kerekes J. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment using three root canal sealers. *Endod Dent Traumatol*. 1988; 4: 114-7.
44. Foreman PC, Barnes IE. A review calcium hydroxide. *Int Endod J*. 1990 ; 23: 283-97.
45. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Letters*. 2006; 160: 171-7.

46. Fouad AF. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J Dent Res.* 1997; 76: 1548-54.
47. Frascino LF. Implante de resina poliuretana vegetal em cranioplastia: Estudo experimental em coelhos [Dissertação de Mestrado]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 1998.
48. Fuentesfria NB, Brito JHM, Weismann R. Avaliação histológica da reação tecidual, frente a implante de poliuretana vegetal, na tíbia de rato. *Rev Odonto Ciênc.* 1998; 13: 29-49.
49. Garcés-Ortiz M, Ledesma-Montes C. Cytotoxicity of Ketac Silver cement. *J Endod.* 1997 ; 23: 371-3.
50. Garcia-Júnior IR. Utilização dos implantes de polietileno-medpor, poliuretana de mamoma e matriz óssea bovina em defeitos ósseos maxilares: análise histológica e histométrica em macacos [Tese de Doutorado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2000.
51. Gerosa R, Menegazzi G, Borin M, Cavalieri G. Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J Endod.* 1995; 21: 446-8.
52. Gessani S, Belardelli F. IFN- γ expression in macrophage and its possible biological significance. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 1998; 9: 117-23.
53. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects for root canal filling materials – histocompatibility, cytotoxicity and mutagenicity. *Clin Oral Invest.* 1997; 1: 5-11.
54. Geurtsen W, Leinenbach F, Krage T, Leyhausen G. Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblasts cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85: 592-7.
55. Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 1998; 69: 1419-25.
56. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnock JS, Tannebaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131-8.
57. Guimarães SAC. Patologia básica da cavidade bucal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
58. Gutiérrez JCR. Avaliação da citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares quanto à liberação de Óxido Nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de

- camundongos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2004.
59. Hamilton TA, Becton DL, Somers SD, Gray PW, Adams DO. Interferon-gamma modulates protein kinase C activity in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem*. 1985; 260: 1378-81.
60. Hetem S, Kanno CM, Matheus MTG. Testes de biocompatibilidade de materiais odontológicos seladores de canais radiculares em germes dentais *in vitro*. *Rev Odontol UNESP*. 1993; 22: 175-85.
61. Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod*. 1985; 11: 535-43.
62. Hong YC, Wang JT, Hong CY. The periapical tissue reactions to a calcium phosphate cement in the teeth of monkeys. *J Biomed Mater Res*. 1991; 25: 485-98.
63. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang .C. 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: 153-8.
64. Huang TH, Lee H, Kao CT. Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *J Endod*. 2001; 27: 744-8.
65. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15: 767-71.
66. Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1992; 211: 177-82.
67. Ignácio H. Utilização do cimento derivado do polímero da mamona no preenchimento de falha óssea. Estudo experimental em coelhos [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina da USP; 1995.
68. Janeway Jr CA, Traves P. Imunidade mediada por células T. In: Janeway Jr, CA, Traves P. *Imunologia: sistema imunológico na saúde e na doença*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p. 132-156.
69. Jörg W, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharmacol*. 2005; 288: 369-76.

70. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.
71. Kardon BP, Kuttler S, Hardigan P, Dorn SO. An in vitro evaluation of the sealing ability of a new root-canal-obturation system. *J Endod*. 2003; 29: 658-61.
72. Karnovsky ML, Lazdins JK. Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol*. 1978; 121: 809-13.
73. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorption and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999; 44: 55-66.
74. Kharmandayan P. Estudo da interface de contato entre osso e implantes de poliuretano com e sem carbonato de cálcio, empregando microscopia de luz e eletrônica de varredura em coelhos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina da UNIFESP; 1997.
75. Kim SK, Karabucak B, Welsch H, Simchon S, Kim S. Intracellular mechanism of substance P-induced vasodilatation in bovine dental pulps. *J Endod*. 2001; 27: 231-4.
76. Kin J, Lee J, Bae K. Cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers. *J Endod*. 2003; 29: 312-4.
77. Ko HJ, Lim SS. Tissue levels of cytokines in pulpal and periapical pathosis. *J Endod*. 1997; 23: 269-73
78. Kobayashi M, Okada N, Okamatsu Y, Mugikura K, Nishihara T, Hanazawa S, et al. Intracellular interleukin-1 alpha production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. *J Dent Res*. 1999; 78: 840-9.
79. Kolokouris I, Economides N, Beltes B, Vlemmas I. In vivo comparison of the compatibility of two canal sealers implanted in to the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod*. 1998; 24: 82-5.
80. Kontakiotis E, Nakau M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J*. 1995; 28: 185-9.
81. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Beltes P, Geromichalos GD, Kortsaris AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol*. 1998; 14: 182-5.
82. Kraus B. Formation of giant cells in vivo. *Immunobiol*. 1982; 161: 2790-7.

83. Lara VS. O papel inflamatório dos constituintes dentários humanos: esmalte e dentina [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina da USP; 1997.
84. Leal JM, Holland R, Esberard RM. Sealapex, CRCS, Fill Canal e N-Rickert, estudo da biocompatibilidade em tecido subcutâneo do rato. *Odontol Clin.* 1988; 2: 7-14.
85. Leira F, Louzao MC, Vieites JM, Botana LM, Vieytes MR. Fluorescent microplate cell assay to measure uptake and metabolism of glucose in normal human lung fibroblasts. *Toxicol in vitro.* 2002; 16: 267-73.
86. Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Silva RS. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88: 221-5.
87. Leonardo MR, Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15: 28-32.
88. Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers – histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod.* 1997; 23: 428-32.
89. Leonardo MR, Leal JM. Fases do tratamento do sistema de canais radiculares. *Endodontia: tratamento de canais radiculares.* São Paulo: Ed. Médica Panamericana; 1998.
90. Leonardo RT. Avaliação microscópica da reação apical e periapical frente a dois cimentos obturadores de canais radiculares à base de hidróxido de cálcio (CRCS e Sealapex) em dentes de cães [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 1992.
91. Leonardo RT. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos, quanto à alteração morfológica e a liberação de peróxido de hidrogênio, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos [Tese de Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 1997.
92. Lopes-Farré A, Rodríguez-Feo JA, Sánchez De Miguel L, Rico L, Casado S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: 1095-109.
93. Lovschall H, Eiskjaer M, Arenholt-Bindslev D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. *Toxicol in vitro.* 2002; 16: 63-9.
94. McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1- β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 1990; 25: 207-14.

95. Mangan DF, Mergenhegen SE, Wahl SM. Apoptosis in human monocytes possible role in chronic inflammatory diseases. *J Periodontol.* 1993; 64: 461-6.
96. Mangan DF, Welch GR, Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 1991; 146: 1541-6.
97. Markhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. *Hum Immunol.* 1998; 59: 571-9.
98. Maseki T, Yasumura K, Nanba I, Kobayashi E, Nakamura H. Alterations in macrophages after exposure to root canal filling materials. *J Endod.* 1996; 22: 450-4.
99. Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly development root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endod.* 1989; 15: 60-7.
100. 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: 24-7.
101. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16:1-8.
102. Meyron SD, Brook AM. In vitro comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *Int Endod J.* 1990; 23: 203-10.
103. Miletić, I, Anić, I., Karlović, Z., Marsan, T., Pezelj-Ribarić, S., Osmak, M. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16: 287-90.
104. Miletić I, Nevena Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. *J. Endod.* 2005; 31: 307-9.
105. Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod.* 1995; 21: 622-4.
106. Mjör IA, Pindborg JJ. *Histology of the human tooth.* Copenhagen: Munksgaard; 1973.
107. Molloy D, Goldman M, White RR, Kabani S. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73: 490-3.
108. Molnar E.J. Residual eugenol form zinc oxide-eugenol compounds. *J Dent Res.* 1967; 46: 645-9.
109. Moncada S, Higgs A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995; 9: 1319-30.

110. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-42.
111. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
112. Nakamura M, Yasuda K, Yamagishi Hatayama T, Oshima H. Stress protein assay for the evaluation of cytotoxicity of dental amalgam. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15:1-5.
113. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987; 79:319-26.
114. Norris KA, Schrimpf EJ, Flynn LJ. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 1995; 63: 2793-6.
115. North RJ. The concept of the activated macrophage. *J Immunol.* 1978; 121: 806-9.
116. O'Boskey Jr FJ, Panagakos FS. Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture. *J Endod.* 1998; 24: 7-10.
117. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Consejo canadiense de protección de los animales. 1998 [citado 2004 Jul 8]. Disponible em: <http://www.ccac.ca/guides/spanish/spantofc.htm>
118. Olson B, Sliwkowski A, Langeland KO. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7: 355-69.
119. Orban B. The problem of root canal treatment. *J Am Dent Assoc.* 1932; 19:1384-8.
120. Öztan DM, Yilmaz S, Kalayci A, Zaimoğlu L. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *J Oral Rehabil.* 2003; 30: 425-9.
121. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium – derived, relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-6.
122. Park SY, Ji GE, Ko YT, Jung HK, Ustunol Z, Pestka JJ. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cell exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol.* 1999; 46: 231-41.
123. Pascon EA. Biocompatibilidade dos materiais endodônticos: biocompatibilidade da resina poliuretana derivada da mamona [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

124. Perala DG, Chapman RJ, Gelfand JA, Callahan MV, Adams DF, Lie T. Relative production of IL-1 beta and TNF-alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J Periodontol.* 1992; 63: 426-30.
125. Perassi FT. Liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2000.
126. Perdigon G, Nader De Macias ME, Alvarez S, Oliver G, Pesce De Ruiz Holgado A. Effect of perorally administrated lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun.* 1986; 53: 404-10.
127. Pertot WJ, Camps J, Remusat M, Proust JP. "In vivo" comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73:613-20.
128. Pertot WJ, Stephan G, Tardieu C, Proust JP. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Dyract and Super Eba. *J Endod.* 1997; 23: 315-9.
129. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immun Methods.* 1980; 38: 161-70.
130. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immun Methods.* 1981; 46: 211-26.
131. Pissiotis E, Spangberg LS. Biological evaluation of collagen gels containing calcium hydroxide and hydroxyapatite. *J Endod.* 1990; 16: 468-73.
132. Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *J Dent.* 2006; 34: 35-40.
133. Puricelli E, Baraldi CE, Ponzoni D, Peschke R. Estudo histológico do polímero poliuretano da mamona implantado no ângulo mandibular de ratos. *Rev Fac Odontol Porto Alegre.* 1999; 40: 37-40.
134. Queiroz CES. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto à liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1997.

135. Quintero JC, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Agarwal S. LPS Responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor-alpha. *J Dent Res.* 1995; 74: 1802-11.
136. Rasquin LC. Avaliação histopatológica da reparação apical e periapical em dente de cães portadores de lesão periapical crônica, experimentalmente induzida, após tratamento de canais radiculares e obturação com 3 cimentos à base de hidróxido de cálcio [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1997.
137. Rasquin OM. Citotoxicidade dos cimentos endodônticos frente aos macrófagos [Tese de Livre Docência]. Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da Universidade Gama Filho; 2000.
138. Roggendorf MJ, Ebert J, Petschelt A, Frankenberger R. Influence of moisture on the apical seal of root canal fillings with five different types of sealer. *J Endod.* 2007; 33:31-3.
139. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. São Paulo: Ed. Manole; 1999.
140. Roslindo NC, Roslindo EB, Hetem S, Da Mata, AC, Malagoli DM. Biocompatibilidade da resina poliuretana vegetal e germes dentários in vitro. *Rev Odontol UNESP.* 1997; 26: 265-74.
141. Rossi M, Whitcomb S, Lindemann R. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production by human monocytes cultured with L-thyroxine and thyrocalcitonin: relation to severe root shortening. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996; 110: 399-404.
142. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Commun.* 1993; 191: 503-8.
143. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent.* 1994; 22: 6-11.
144. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod.* 2002; 28: 749-53.
145. Schwarze T, Fielder I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod.* 2002; 28: 784-6.
146. Shabanhang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, Mcmillan P. A comparative study of root end induction using osteogenic protein-I, calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod.* 1999; 25: 1-5.

147. Shipper G, Orstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material. *J Endod.* 2004; 30: 342-7.
148. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or resilon. *J Endod.* 2005; 31: 91-6.
149. Silva LAB. Cimentos obturadores de canal radicular à base de hidróxido de cálcio – avaliação histopatológica do reparo apical e periapical em dentes de cães, da resposta inflamatória em tecido subcutâneo e da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos. Avaliação do pH, concentração de cálcio total e condutividade [Tese de Livre Docência]. Riberão Preto: Faculdade de Odontologia da USP; 1995.
150. Silva LAB, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod.* 1997; 23: 86-90.
151. Soares IJ, Goldberg F, Massone EJ, Soares IM. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *J Endod.* 1990; 16: 166-9.
152. Spangberg L. Biologic effects of root canal filling materials 4. Effect in vitro solubilized root canal filling materials on HeLa cells. *Odontol Rev.* 1989; 20: 289-99.
153. Spangberg LSW. *Experimental endodontics.* Boca Raton: CRC Press; 1990.
154. Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Ann Rev Biochem.* 1998; 67:227-64.
155. Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 89-96.
156. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 494-502.
157. Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5: 139-46.
158. Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblasts cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod.* 2001; 27: 571-3.
159. Takahara K, Onodera A, Matsumoto K. Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 200-7.

160. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J.* 1998; 31: 311-25.
161. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10: 213-9.
162. Tani-Ishii N, Tsunoda A, Teranaka T, Umemoto T. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 α and TNF- α . *J Dent Res.* 1999; 78: 1617-23.
163. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 85-9.
164. Tavano O, Pavan AJ, Silva MJ, Guimarães SAC. Estudo da densidade radiográfica digital do tecido ósseo face ao implante do polímero de mamona em coelhos. *Rev Fac Odontol Bauru.* 1999; 7: 53-8.
165. Tay FR, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, Pashley DH, Mak YF, et al. Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. *J Endod.* 2005; 31: 541-9.
166. Taylor-Robinson AW, Liew F Y, Severn A, Xu D, Mcsorley SJ, Garside P, et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24: 980-4.
167. Teixeira HM, Kuramae M, Ramalho LTDO. Reação à resina vegetal de mamona com carbonato de cálcio durante o processo de reparo em defeitos ósseos induzidos no corpo da mandíbula. *Rev Odontol UNESP.* 1999; 28: 63-72.
168. Teixeira MM, Williams TJ, Hellewell PG. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol.* 1993; 110:1515-21.
169. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford RT, Kariyawasam SP. Tissue reaction to implanted Super-EBA mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J Endod.* 1995; 21: 569-71.
170. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford RT, Kettering JD. Citotoxicity of four root end filling materials. *J. Endod.* 1995; 21: 489-92.

171. Tracey KJ, Lowey SF, Cerami A. Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. *J Immunol.* 1973; 8: 685-93.
172. Tronstad L, Barnett F, Flax M. Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. *Endod Dent Traumatol.* 1988; 4:152-9.
173. Trowbridge HO, Emiling RC. *Inflamação: uma revisão do processo.* São Paulo: Quintessence; 1996.
174. Unanue ER, Beller DI, Calderon J, Kierly JM, Stadecker MJ. Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. *Am J Pathol.* 1976; 85: 465-78.
175. Vajrabhaya L, Sithisarn P, Wilairat P, Leelaphiwat S. Comparison between sulphorhidamina – B dye staining and Cr51 – release method in cytotoxicity assay of endodontic sealers. *J Endod.* 1997; 23: 355-7.
176. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol.* 1992 ; 10: 411-52.
177. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vivo. *Infect Immunol.* 1994; 62: 5177-82.
178. Virág L, Kerékgyártó C, Fachel J. A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1995; 185: 199-208.
179. Wang CY, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12: 65-71.
180. Watts A, Paterson RC. Initial biological testing of root canal sealing materials: a critical review. *J Dent.* 1992; 20: 259-65.
181. Wellicome SM, Thornhill MH, Pitzalis C, Thomas DS, Lanchbury JSS, Panayi GS, et al. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by tumor necrosis factor, IL-1, or lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1990; 144: 2558-65.
182. Williams DF. Biocompatibility: an overview. In: Williams DF. *Concise encyclopedia of medical and dental materials.* Oxford: Pergamon; 1990. p.51-9.
183. Yesiloy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65: 459-67.

184. Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res.* 1997; 32: 279-86.
185. Zmener O. Tissue response to a new Methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod.* 2004; 30: 348-51.
186. Zmener O, Cabrini RL. Effects of three calcium hydroxide based materials on human blood monocytes and lymphocytes. *Endod Dent Traumatol.* 1987; 3: 28-32.
187. Zmener O, Gugliemotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of rat. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 66-72.

ANEXOS

SOLUÇÃO TAMPÃO DE FOSFATO DE POTÁSSIO Ph 7,0

9,7 ml do tampão fosfato
0,2 ml de vermelho de fenol
0,1 ml de peroxidase raiz forte
140 mμ de NaCl
5,5 mμ de dextrose

REAGENTE DE GRIESS

1,0 g – sulfanilamida (Sigma)
0,1 g – N(2 naftil) e tilenodiamina (Sigma)
2,5 ml – ácido ortofosfórico (Merck)

Completar o volume de 100 ml com água deionizada e guardar na geladeira em um frasco escuro.

SOLUÇÃO DE LÁZARUS

Violeta de Genciana (pó) 1% - 2 ml
Ácido Acético Glacial – 3 ml
H₂O destilada q.s.p. – 100 ml

MEIO DE CULTURA

RPMI – 1640 (Sigma)
Com L-Glutamina e sem Bicarbonato de Sódio
Armazenado à 1-8°C

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)

<u>Componentes</u>	<u>g/l</u>
L-Arginine (Free Base)	0,2
L-Asparagine (Anhydrous)	0,05
L-Aspartic Acid	0,02
L-Cystine.2HCl	0,0652
L-Glutamic Acid	0,02
L-Glutamine	0,3
Glycine	0,01
L-Histidine (Free Base)	0,015
Hidroxy-L-Proline	0,02
L-Isoleucine	0,05
L-Leucine	0,05
L-Lysine.HCl	0,04
L-Methionine	0,015
L-Phenylalanine	0,015
L-Proline	0,02
L-Serine	0,03
L-Threonine	0,02
L-Tryptophan	0,005
L-Tyrosine.2Na.2H ₂ O	0,02883
L-Valine	0,02
Biotin	0,0002
Choline Chloride	0,003
Folic Acid	0,001
myo-Inositol	0,035
Niacinamide	0,001
D-Panthenic Acid Hemicalcium	0,00025
PABA	0,001
Pyridoxine.HCl	0,001
Riboflavin	0,002

Thiamine.HCl	0,001
Vitamin B ₁₂	0,000005
Calcium Nitrate.4H ₂ O	0,1
Magnesium Sulfate (Anhydrous)	0,04884
Potassium Chloride	0,4
Sodium Chloride	6,0
Sodium Phosphate Dibasic (Anhydrous)	0,8
D-Glucose	2,0
Glutathiane. Reduced	0,001
Phenol Red. Na	0,0053

RPMI 1640 (Completo)

Penicilina – 100 U/ml

Estreptomicina – 100 µg/ml

L-Glutamina – 2 µg/ml

Soro fetal bovino – 5%