

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Ariete Patrícia Rabello

*Efeito da laserterapia na viabilidade de
macrófagos e sua produção de óxido nítrico
frente a cimentos endodônticos*

Araraquara

2012

Ariele Patrícia Rabello

*Efeito da laserterapia na viabilidade de macrófagos
e sua produção de óxido nítrico frente a cimentos endodônticos*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

Araraquara

2012

Rabello, Ariele Patrícia

Efeito da laserterapia na viabilidade de macrófagos e sua produção de óxido nítrico frente a cimentos endodônticos / Ariele Patrícia Rabello. - Araraquara: [s.n.], 2012.

90 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

1. Macrófagos 2. Sobrevivência celular 3. Óxido nítrico 4. Terapia a laser de baixa intensidade I. Título

Ariele Patrícia Rabello

*Efeito da laserterapia na viabilidade de
macrófagos e sua produção de óxido nítrico
frente a cimentos endodônticos*

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

2º Examinador: Profª Drª Flaviana Bombarda de Andrade

3º Examinador: Profª Drª Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara, 29 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

ARIELE PATRICIA RABELLO

NASCIMENTO	15.07.1983 –BARIRI/SP
FILIAÇÃO	Maria Aparecida Furlanetto Rabello Lupércio Cláudio Rabello
2002/2006	Curso de Graduação – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2008/2010	Curso de Especialização em Endodontia – Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO
2010/2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Área de concentração Endodontia), nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação:

A Deus,

pela sua proteção e motivo de força,

por conceder a oportunidade de

realização e conclusão de mais uma

etapa importante em minha vida

Aos meus pais,

a quem tanto amo, a quem devo tudo, alicerce da minha vida,

sempre prontos a me proteger, me confortar, me escutar,

me incentivar e dar apoio, exemplos a serem seguidos

de honestidade, trabalho, proteção e amor.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”** (UNESP), na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald e vice-reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e vice-diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon.

Ao *Departamento de Odontologia Restauradora* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior e vice-chefe Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia*, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, pelo constante estímulo à pesquisa.

À *todos os professores do curso de pós-graduação*, pelos conhecimentos, apoio e amizade a mim dedicados.

Ao **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, pela valiosa orientação na realização desse trabalho; pelos conselhos e pelos ensinamentos tanto para o desenvolvimento desse trabalho, como para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela oportunidade de poder aprender com você, pela compreensão, pela confiança e amizade conquistadas ao longo desses anos.

Aos **docentes do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos professores da disciplina de Endodontia, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Profa. Dra. Gisele Faria, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo e Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, por todo o conhecimento transmitido a mim, pelo estímulo a seguir a pós-graduação, pela amizade e harmonioso convívio, fazendo com que eu me sentisse feliz na minha segunda casa.

Aos meus amigos da pós-graduação, **Natália, Ana Lívia, Arturo, Fernando, Camila, Carol, Rosy, Flávia, Matheus, Raqueli, Rafael, Norberto, Érika, Adriana, Paula, Guilherme**, pela amizade, respeito e boa convivência.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** desta Faculdade, Creusa, Diva, Conceição, Cida, Marinho, Nelly, Vanderlei, Rosângela e Priscila. Tenho enorme carinho por todos vocês, obrigada pela amizade, pelos bate-papos, e por cada “Bom dia” com um lindo sorriso no rosto!

À *Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos*, pela alegria e espontaneidade, pelo amparo nas minhas dúvidas sobre a metodologia empregada nesse trabalho e por ter permitido o uso do Laboratório de Imunologia Clínica para realização dessa pesquisa. Meu muito obrigada!

Ao *Prof. Dr. Carlos Alberto de Sousa Costa*, responsável pelo Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNSP, por disponibilizar o laboratório para a realização dos experimentos. Obrigada pela confiança, e pela oportunidade de participar das reuniões de seu grupo de alunos, enriquecimento de meus conhecimentos. Serei sempre grata ao senhor.

À *Djamile Cordeiro de Mattos*, pela imensa paciência em me ensinar e me ajudar com a parte experimental e estatística desse trabalho. Obrigada pela amizade conquistada!

À *Fernanda Gonçalves Basso*, pela ajuda para a realização da parte experimental deste estudo, por transmitir seus conhecimentos a mim, pela amizade demonstrada.

À *todos os amigos* que fiz no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia de Araraquara e no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara

À *Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros*, pela ajuda essencial na etapa final desse trabalho.

Aos *funcionários da Seção de Pós-Graduação*, Mara, Alexandre e Sergio, pela ajuda em todas as horas necessárias, pelo gentileza em sempre me ouvir e esclarecer todas minhas dúvidas sobre a pós-graduação, pelo carisma e simpatia com que sempre me atendem, e principalmete pela educação e paciência em todas os momentos

Aos *docentes do Departamento de Odontologia Social*, pela linda convivência durante os anos que passei por lá.

À *Profa. Dra. Camila Pinelli*, pela amizade conquistada, pelo carinho durante todo o período em que tive a oportunidade de trabalhar com ela, pelo incentivo e coragem transmitida a mim para que eu seguisse a vida acadêmica. Obrigada pela generosidade em compartilhar conhecimento e cultur: Camila, você é especial para mim, tenho muito carinho por você!

Aos *funcionários da Biblioteca*, Ceres, Marley, Adriano, Inês, Silvia, Eliane e Disleide, pela educação, respeito e boa vontade no auxílio das pesquisas bibliográficas.

Aos *funcionários da Seção de Esterilização*, por serem sempre prestativos e prontos para ajudar.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A *Deus*, pois em ELE nada existe. Por estar presente em todos os dias da minha vida, guiando meus passos e iluminado meu caminho.

Ao *meu anjo da guarda*, por estar sempre me protegendo e me acompanhando.

Aos *meus pais, Maria e Lupércio*, pela educação recebida desde sempre, pelo apoio emocional e financeiro, por toda uma vida de dedicação nunca me negando nada, pelo imenso esforço para que eu realizasse mais um sonho, por todo amor e carinho recebido, pelo exemplo de vida e fortaleza que são para mim. Amo vocês!

À *minha irmã Aline*, pelo amor, amizade, companheirismo e otimismo que só ela tem, e por todos os “eu já sabia” ouvidos após conversarmos sobre algo que eu tinha conquistado. Amo você!

À *minha tia Cacilda*, pela sua constante preocupação comigo, pelas promessas feitas, por seu amor e carinho.

Ao *meu querido Elvis*, pelo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade, alegria, admiração. Obrigada pelo incentivo aos estudos, pelo respeito, e pela paciência e entendimento por cada fim de semana, férias, ou qualquer outro dia longe devido minhas atividades da faculdade. Obrigada por deixar meus dias mais lindos! Você é muito importante para mim! Amo você!

À *minha nova família*, Luzia, Flor, Emerson, Anelisa, Evando, Andreza e Hércules, pela linda convivência, pelos momentos de distração e risadas aos fins de semana e fins de tarde.

Aos *meus sobrinhos Bianca, Tulio, Luiza e Leonardo*, pelo colorido especial que dão à minha vida!

Às *minhas queridas amigas Alana, Gisselle e Roberta*, por tudo o que fizeram por mim, pelo maravilhoso convívio, pelos conselhos, risadas, puxões de orelha, pelo carinho e atenção, pela ajuda nas horas complicadas, pela paciência, pelo afeto, carisma, alegria. Obrigada por fazerem parte de uma etapa tão importante em minha vida, tão importante quanto vocês são para mim!

À *minha querida amiga Dani*, por todos esses anos de convívio, pela amizade sincera, pelo acolhimento na casa de seus pais, pelos conselhos. Gosto muito de você!

Aos *meus amigos de Bariri*, Anelisa, Sueli, Andréa, Marquinhos, Gisele, Leandro, Carol, Nando, pela convivência, pela alegria, pela grande amizade, por sempre estarem prontos para tudo.

*Obrigada a todos que de alguma forma
colaboraram na realização deste trabalho.*

"Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena

Acreditar no sonho que se tem

Ou que seus planos nunca vão dar certo

Ou que você nunca vai ser alguém

Tem gente que machuca os outros

Tem gente que não sabe amar

Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar

Confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança!"

Renato Russo

SUMÁRIO

Resumo.....	16
Abstract	18
INTRODUÇÃO.....	19
REVISÃO DA LITERATURA.....	23
Macrófagos e Óxido Nítrico.....	23
Laserterapia.....	27
Cimentos endodônticos.....	38
PROPOSIÇÃO.....	51
MATERIAL E MÉTODO	52
RESULTADO	63
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS	79

Rabello AP. Efeito da laserterapia na viabilidade de macrófagos e sua produção de óxido nítrico frente a cimentos endodônticos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Resumo

O presente estudo avaliou o efeito da fototerapia com o laser de baixa intensidade (LBI) infra-vermelho próximo (InGaAsP: LASERTable; $\lambda 780 \pm 3 \text{ nm}$, 25 mW) em linhagem celular de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) expostos à diferentes cimentos endodônticos. Os grupos foram divididos de acordo com o material obturador e a presença ou não de irradiação, além dos grupos controle, sendo: G1: controle negativo - somente células, G2: células + laser, G3: controle positivo – LPS, G4: LPS + laser, G5: Endofill, G6: Endofill + laser, G7: AH Plus, G8: AH Plus + laser, G9: Sealapex e G10: Sealapex + laser. A viabilidade celular foi determinada por meio do teste de MTT e a produção de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess. A irradiação com LBI influenciou significativamente a viabilidade de macrófagos expostos aos três materiais obturadores ($p < 0,001$), sendo que o G8 foi o que resultou em maior número de células viáveis ($p < 0,001$). Não houve interferência do LBI sobre a produção de óxido nítrico em nenhum dos grupos estudados. Concluiu-se que todos os cimentos endodônticos permitiram índices significativamente maiores de viabilidade celular quando da aplicação do LBI; o cimento AH Plus apresentou aumento significativamente maior de viabilidade dos macrófagos em relação aos demais cimentos quando da aplicação

do LBI , seguido do Sealapex e Endofill; o LBI não interferiu de forma significativa na produção de NO por parte dos macrófagos expostos a nenhum dos cimentos endodônticos estudados.

Palavras-chave: Macrófagos; Sobrevivência celular; Óxido nítrico; Terapia a laser de baixa intensidade.

Rabello AP. Effect of phototherapy on macrophages viability and your nitric oxide production against to sealers [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

Abstract

The present study evaluated the effect of phototherapy with low intensity laser (LLLT) near infrared (InGaAsP: LASERTable; $\lambda 780 \pm 3 \text{ nm}$, 25 mW) in cell line mouse macrophages (RAW 264.7) exposed to different sealers. All the groups were divided according to the filling material with presence or absence of irradiation: G1: negative control - only cells, G2: laser + cells, G3: positive control - LPS, G4: LPS + laser, G5: Endofill, G6: Endofill + laser, G7: AH Plus, G8: AH Plus + laser, G9, G10 and Sealapex: Sealapex + laser. Cell viability was determined using the MTT assay and production of nitric oxide (NO) by the Griess method. The irradiation with LLLT significantly affect the viability of macrophages exposed to three filling materials ($p < 0.001$), and the G8 was resulted in a greater number of viable cells ($p < 0.001$). There was no interference from the LBI on nitric oxide production in any groups. It was concluded that all the sealers was significantly higher levels of cell viability when applying the LBI, and the AH Plus showed significantly greater viability of the macrophages relative to the other cements when applying the LBI, and followed by Sealapex Endofill; the LBI didn't interfere significantly in the production of NO by macrophages exposed to any sealers studied.

Keywords: Macrophages; Cell Survival; Nitric oxide; Laser therapy, low-level.

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico é fruto de um conjunto de procedimentos interdependentes desde que perfeitamente executados e finalizados com adequada obturação dos canais radiculares, a qual deve preencher o espaço interno previamente ocupado pela polpa, dentro de um limite apropriado evitando a invasão dos tecidos periodontais. Assim, a obturação dos canais radiculares é vista como um procedimento de grande relevância para o êxito em Endodontia⁴⁶.

A obturação é realizada pela associação de materiais em estado sólido, os cones de guta percha, resina ou silicone, e materiais em estado plástico, os cimentos endodônticos^{46,48}. Atualmente, apesar da grande variedade de cimentos com diferentes composições químicas^{46,48} disponíveis comercialmente, é de fundamental importância que esses materiais apresentem equilíbrio entre as propriedades físico-químicas e biológicas, não sendo irritantes aos tecidos apicais e periapicais⁴².

Entre os diversos materiais obturadores comercializados, encontram-se os cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol (OZE); à base de resina epóxica e à base de hidróxido de cálcio.

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (OZE) começaram a ser utilizados na Endodontia em 1936²⁵ e ainda hoje são mundialmente utilizados por cirurgiões dentistas devido à facilidade de aquisição, baixo custo e propriedades físico-químicas satisfatórias^{4,8}. No entanto, apresentam efeitos irritantes e citotóxicos aos tecidos apicais e periapicais devido a presença do eugenol na sua

composição^{4,8,17,71}, prejudicando significativamente o reparo tecidual quando este tipo de cimento é empregado^{4,44}.

Na busca, não só de propriedades físico-químicas adequadas, mas também de se obter as propriedades biológicas peculiares ao hidróxido de cálcio em um mesmo cimento endodôntico, surgiram os cimentos à base de hidróxido de cálcio como grandes opções de escolha em relação à tolerância tecidual⁴⁶. O Sealapex (SybronEndo/Kerr, EUA) foi um dos primeiros cimentos à base de hidróxido de cálcio a ser comercializado, sendo composto por uma pasta base e uma pasta catalisadora. Seu principal componente é o óxido de cálcio, que ao reagir com a água, dará origem ao hidróxido de cálcio⁴⁸.

Ainda, dentre as modalidades de cimento endodôntico encontradas, temos os materiais à base de resinas epóxicas⁴⁶. Na década de 90, foi lançado o cimento AH Plus (Dentsply/De Trey, Konstanz, Alemanha), composto por duas pastas (base e catalisadora) visando uma adequada capacidade seladora e boa tolerância tecidual⁴⁴.

Apesar do surgimento de novos cimentos endodônticos com melhor tolerância tecidual, cimentos à base de OZE, mesmo apresentando propriedades biológicas deficientes^{69,74,76}, ainda são mundialmente utilizados⁸. Esse fato pode ser visto como um estímulo à busca de novos recursos tecnológicos que possam ser aplicados visando-se atenuar seus efeitos indesejáveis.

Nos últimos anos, a fototerapia a laser tem sido utilizada após a obturação do canal radicular para modular o processo inflamatório apical, na tentativa de melhorar o processo de reparação tecidual⁷³. Seus efeitos terapêuticos sobre os

tecidos incluem ação analgésica e antiinflamatória^{15,50}. Pesquisas utilizando a laserterapia têm demonstrado resultados efetivos, na redução da sintomatologia dolorosa e do processo inflamatório³⁷ e no processo de reparo de tecidos lesionados^{19,23}.

Em estudos histológicos recentes, melhor resposta tecidual com redução da resposta inflamatória e aceleração do processo de reparo foram obtidos quando o laser de baixa intensidade (LBI) foi empregado com a utilização de um cimento à base de OZE^{8,13,71}.

Embora existam estudos a respeito do efeito da laserterapia sobre a inflamação em tecido subcutâneo e periapical decorrente do emprego de cimentos endodônticos menos biocompatíveis, as informações são limitadas em relação à ação do LBI sobre as células participantes do processo inflamatório, em especial os macrófagos, mesmo sabendo-se da liberação de mediadores químicos por este tipo celular quando exposto aos cimentos endodônticos^{26,42,52,60,63,68,73}.

O contato dos cimentos endodônticos, seja direta ou indiretamente, com os tecidos periapicais pode estimular células inflamatórias, principalmente macrófagos^{9,73}. Esses, estão envolvidos no processo de cicatrização apical^{47,60,73} e podem ser ativados por vários estímulos que são capazes de aumentar suas atividades biológicas³⁵. Sua principal atividade é a fagocitose, e durante este processo, liberam grande quantidade de mediadores que atraem as células vizinhas para a área afetada a fim de reconstruí-la¹². Apresentam grande capacidade de síntese e secreção de substâncias intra e extracelulares, entre elas compostos intermediários do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO)^{12,32,35,60,62,64}.

O NO é liberado quando os macrófagos entram em contato com uma partícula estranha, na tentativa de realizar a fagocitose. Quando liberado em grandes quantidades pode aumentar o metabolismo celular e potencializar o processo inflamatório; e em pequenas quantidades, favorece o processo de isolamento do corpo estranho, citodiferenciando fibroblastos e exacerbando a síntese protéica e colagênica, o que caracteriza reparo pós-obturação com formação de cápsula fibrosa ou de tecido mineralizado²⁶.

Assim, torna-se oportuno um estudo avaliando a a o do LBI na viabilidade celular e na produ o de óxido nítrico por macrófagos mediante o contato, não somente com cimentos endodônticos com propriedades biológicas aceitáveis, mas também e principalmente, diante de cimentos com reconhecida citotoxicidade.

REVISÃO DA LITERATURA

MACRÓFAGOS E ÓXIDO NÍTRICO

Essas células originam-se dos monócitos presentes no sangue, os quais migram através da parede dos vasos sanguíneos para os tecidos e órgãos, transformando-se em macrófagos^{35,64}. São heterogêneos na expressão de seus genes e de suas atividades celulares, com papéis benéficos ou destrutivos na homeostasia dos tecidos e na defesa do hospedeiro. Interagem com várias células por meio de seus diversos receptores de membrana e respostas secretoras, regulando assim, as respostas imunológicas inata e adquirida⁶⁴.

Os macrófagos apresentam grande capacidade de deformidade, responsável pela sua principal atividade num processo inflamatório, a fagocitose¹². Além disso, exercem atividades relacionadas ao reconhecimento do que é estranho ao organismo, apresentando esses antígenos a outras células, coordenando assim, a resposta imunológica e inflamatória¹², por meio da produção de citocinas (Fator de Necrose Tumoral alfa - TNF- α , Interleucinas - IL-1, IL-6, IL-12, etc.) e compostos intermediários do nitrogênio (óxido nítrico - NO) e do oxigênio (peróxido de hidrogênio - H₂O₂)³⁵.

Marletta et al.⁴⁹ (1988) estudaram a formação de óxido nítrico a partir do aminoácido L-arginina em macrófagos da linhagem RAW 264.7, para verificar se essa síntese era semelhante à observada em células endoteliais. Os autores confirmaram que a formação de NO é dependente da L-arginina e essa atividade é

encontrada somente no citosol de células ativadas. Sendo que a atividade enzimática estava presente somente nas células RAW 264.7 ativadas por LPS ou INF- γ . Os autores concluíram que, em macrófagos, o NO é um intermediário da via L-arginina para síntese de nitrito e nitrato, e esta via é necessária para estas células realizarem sua atividade de morte celular.

Em uma revisão da literatura sobre a fisiologia do NO, em 1995, Kuo e Schroeder⁴¹ verificaram que o óxido nítrico é sintetizado por enzimas específicas das células, as óxido nítrico sintases (NOS). Essas são encontradas em vários tipos de tecidos e células, e são divididas em dois sub-tipos, constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS). A cNOS está normalmente presente nas células do endotélio, neurônios e plaquetas e são expressas continuamente na ausência de estímulo. Já a iNOS é expressa em macrófagos, hepatócitos e músculo liso vascular após estímulo imunológico ou inflamatório resultantes de uma infecção ou dano tecidual, ou após estimulação com endotoxinas e citocinas.

Maseki et al.⁵¹ (1996) avaliaram *in vitro* o processo de fagocitose de diferentes cimentos endodônticos por macrófagos peritoneais de ratos. Partículas de 5 μm dos materiais foram colocadas em contato com as culturas celulares por 30, 60 e 120 minutos. Após os períodos experimentais, foram feitas as análises de viabilidade celular e do número de macrófagos que continham partículas fagocitadas. Os resultados mostraram que, a taxa de fagocitose do Finapec APC (um cimento que contém hidroxiapatita) em 30, 60 e 120 minutos foi significativamente maior que para os materiais Sealapex (cimento à base de hidróxido de cálcio), Canals e Canal-N (cimentos à base de OZE) ($p < 0,05$), e

similar ao grupo controle (esferas de látex). A fagocitose das partículas de Canals-N e Selapex foi de 30 a 40% em todos os períodos experimentais. O Cimento Canals apresentou a menor taxa de fagocitose, sendo significativamente menor ($p < 0,01$) que o controle em todos os períodos experimentais. Culturas contendo partículas do Finapex APC apresentaram viabilidade de 95% aos 60 e 120 minutos. Canals-N, Sealapex e Canals resultaram em 78%, 85% e 63% de células viáveis, respectivamente, aos 120 minutos. Todos os grupos experimentais apresentaram menos células viáveis que o controle. Os autores concluíram que o cimento Canals apresentou baixo número de macrófagos com partículas fagocitadas, porém alta citotoxicidade (63% de células viáveis após o último período experimental) e que o Finapex APC apresentou maior taxa de fagocitose, no entanto baixa citotoxicidade.

Burney et al.¹⁰ (1997) investigaram a citotoxicidade induzida pelo óxido nítrico sobre células de ovário de hamster chinês (CHO-AA8) e linfoblastóides (TK6). Para determinar os efeitos que levam a morte celular, tanto a curto como a longo prazo, vários testes foram utilizados para compreender o maior mecanismo de citotoxicidade do NO. Em conclusão, a toxicidade induzida por NO é um processo extremamente complexo que envolve inibição da síntese de DNA, inativação mitocondrial, lise da membrana celular, interrupção do ciclo celular, formação de filamentos de DNA com ruptura, e apoptose. As células TK6 demonstraram ser mais suscetíveis a toxicidade induzida por NO do que células CHO-AA8, o que sugere que a ação citotóxica do NO pode ser específica a cada tipo celular.

Em 2002, Sosroseno et al.⁷² realizaram um estudo com objetivo de determinar se o lipopolissacarídeo da bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (LPS-Aac) poderia estimular macrófagos murinos (linhagem de células RAW264.7) a produzir NO, comparado com LPS da *Escherichia coli* (LPS-Ec). As células foram tratadas com LPS-Aac ou LPS-Ec por 24h. Os níveis de NO dos sobrenadantes das culturas foram determinados pela reação de Griess. Os resultados mostraram que o LPS-Aac estimulou a produção de NO por macrófagos RAW264.7 de maneira dose-dependente, porém é um pouco menos potente do que o LPS-Ec.

De acordo com Houghton et al.²⁹ (2009) macrófagos funcionam como a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Assim, sugeriram que proteinases derivadas de macrófagos podem contribuir com as suas propriedades antimicrobianas. Após a fagocitose de micro-organismos por macrófagos, estoques intracelulares de metaloproteinases são movimentados para fagolisossomos, aonde usam um peptídeo antimicrobiano para romper a integridade de estruturas da parede celular na invasão de micro-organismos.

Pappen et al.⁵⁸ (2009) avaliaram a expressão de NO por macrófagos murinos expostos a quelantes endodônticos. Os materiais MTAD, Tetraclean, Smear e EDTA foram diluídos em água destilada obtendo-se 12 concentrações, sendo selecionada a que apresentasse maior viabilidade celular determinada pelo teste de MTT. Essas melhores concentrações foram utilizadas para detecção de NO no sobrenadante das culturas celulares usando-se o método de Griess. Meio de cultura e LPS foram utilizados como controle negativo e positivo,

respectivamente. Os resultados mostraram que todos os quelantes endodônticos apresentaram aumento nas concentrações de NO quando comparados ao controle negativo. O EDTA e Smear Clear foram semelhantes ao controle positivo, o MTAD foi o que induziu menor liberação de NO, seguido do Tetraclean, EDTA e Smear Clear. Os autores concluíram que os materiais estudados apresentam severos efeitos pró-inflamatórios em macrófagos murinos e que se deve ter muito cuidado durante a irrigação de canais radiculares com esses quelantes, evitando a extrusão dos mesmos para os tecidos periapicais.

Em um estudo da literatura a respeito das funções das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), Forstermann, Sessa¹⁸ (2011) mostraram que a NOS induzível (iNOS) leva a produção de grande quantidade de NO quando ativada em macrófagos, o que representa maior princípio citotóxico destas células. Além disso, as altas concentrações de NO produzidas por macrófagos, podem interferir diretamente com a célula alvo causando ruptura e fragmentação do seu DNA.

LASERTERAPIA

Laserterapia de baixa intensidade refere-se ao uso de lasers vermelho ou infra-vermelho próximo com comprimento de onda de 600 a 1100 η m e potência de emissão de 1 a 500 mW. Este tipo de radiação é uma onda contínua ou luz pulsada que consiste em um feixe constante de densidade de energia relativamente baixa (0,04 a 50J/cm²), o qual interage com o tecido alvo ou monocamada de células^{1,59}.

O comprimento de onda do laser é quem determina seu efeito. A luz visível, ou seja, a vermelha, é transmitida através das camadas celulares superficiais, como a derme, epiderme e tecido subcutâneo; já o laser infravermelho próximo tem a capacidade de penetrar no tecido em maior profundidade, sendo absorvido por fotoreceptores e estimulando as funções celulares⁵⁹.

O uso do LBI para fins terapêuticos baseia-se na biomodulação tecidual que ocorre após sua aplicação. Ao utilizá-lo sobre um tecido vivo, devemos lembrar que as células apresentam um determinado limiar de sobrevivência, o qual depende do tecido que está localizada e do seu estado fisiológico⁴³.

Estudos avaliando o efeito do LBI têm sido realizados, no entanto há grande divergência em relação aos protocolos e tipos celulares utilizados.

Almeida-Lopes et al.³ (2001) compararam o efeito do LBI visível e infravermelho na proliferação de fibroblastos da mucosa oral de humanos, utilizando a densidade de energia constante de $2\text{J}/\text{cm}^2$ e diferentes irradiancias. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 5% (déficit nutricional) ou 10% de soro fetal bovino (SFB). Os resultados demonstraram que as células mantidas sob déficit nutricional apresentaram taxa de proliferação celular significativamente menor que os fibroblastos mantidos em condições ideais (meio de cultura suplementado com 10% SFB). No entanto, quando irradiadas, as células em meio de cultura com 5% de SFB apresentaram crescimento similar ou maior do que na presença de 10% de SFB. Assim, o crescimento de células

estressadas após irradiação foi semelhante ao das células em condições ideais de cultivo e o LBI atuou melhorando a proliferação de fibroblastos *in vitro*.

Crisci¹⁴ (2002) avaliou o efeito do LBI, com associação ou não de hidróxido de cálcio, em exposições pulpares induzidas em dentes de ratos. Foi utilizado um laser de diodo semiconductor de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), infravermelho, com comprimento de onda de 785 μm , potência de emissão de 50 mW e densidade de energia de 3 J/cm^2 . Os animais foram divididos em 5 grupos: GI (controle): exposição capeada com hidróxido de cálcio; GII: laser imediato + hidróxido de cálcio; GIII: laser imediato + hidróxido de cálcio + laser após 24 horas; GIV: laser imediato + hidróxido de cálcio + laser após 24 e 48 horas; e GV: somente a aplicação do laser. Após análise histológica dos espécimes aos 7 e 30 dias após os tratamentos, observou-se que a associação do laser com hidróxido de cálcio foi benéfica, sendo que os grupos II e III apresentaram os melhores resultados nos dois períodos experimentais. O LBI, aos sete dias, promoveu uma recuperação acentuada das células pulpares quando comparadas ao grupo do hidróxido de cálcio sem a laserterapia, o que confirmou seu efeito antiinflamatório. Aos 30 dias, o uso do laser também interferiu positivamente no processo de reparo pulpar, pois a polpa respondeu com melhores resultados quando comparado ao grupo do hidróxido de cálcio isoladamente.

Karu et al.³⁸ (2005) investigaram a possibilidade do envolvimento do óxido nítrico no aumento da adesão celular induzido pela irradiação. Células HeLa em suspensão foram irradiadas com laser de diodo (820 μm , 8 - 120 J/m^2)

e laser no intervalo vermelho ao infra- vermelho próximo (600 - 860 η m, 52J/m²) e o número de células aderidas a uma matriz de vidro foi verificado após 30 minutos de incubação. Compostos doadores de NO (nitroprussiato de sódio (NPS), nitroglicerina (NG) e nitrito de sódio (NS)) em várias concentrações, foram adicionadas a cultura celular antes e após a irradiação. O número de células HeLa aderidas ao substrato de vidro aumentou após a irradiação com laser visível e infra-vermelho próximo, o que significa que uma nova subpopulação de células foi estimulada à adesão devido à irradiação, sendo que a quantidade máxima encontrada foi após uso do laser com 820 η m (22%). O NO associado à irradiação também influenciou na aderência das células em aproximadamente 20%. Os doadores de NO sem irradiação não tiveram qualquer influência sobre fixação das células em qualquer uma das concentrações. Assim, o laser e o NO, provavelmente alteram a porcentagem de células aderidas, o que depende tanto dos parâmetros de irradiação, bem como da concentração dos doadores de NO, além da ordem de aplicação de ambos.

Karu, Kolyakov³⁹ (2005) analisaram sete espectros de ação do laser (600-860 η m) em células HeLa. Estímulo da síntese de DNA e de RNA e adesão celular foram avaliados. As células foram cultivadas em frascos de cintilação, e a irradiação foi realizada através do fundo do frasco, com este inclinado de modo que o meio de cultura não ficasse em contato com as células. Houve aumento da adesão celular à matriz de vidro e da síntese de RNA. Para o espectro de 606 η m, comprimento de onda vermelho, as posições de pico, onde há maior absorção do laser pelas células, estão entre 613.5 e 623.5 η m. Para o infra-vermelho próximo,

estão entre 750.7-772.3 η m e 812.5-846.0 η m. No intervalo do comprimento de onda considerado importante para fototerapia (600-860 η m), existem quatro regiões ativas, mas as posições de pico não são exatamente as mesmas para todos os espectros.

Crisci¹³ (2008) avaliou histologicamente o efeito do LBI diodo semiconductor de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) em relação à ação irritante do cimento endodôntico Endofill apresentada após obturação do canal radicular. Vinte e quatro dentes de Macacos-Prego foram submetidos ao tratamento endodôntico, obturação do canal radicular com cimento Endofill e divididos em 3 grupos experimentais, o grupo I recebeu irradiação com LBI vermelho (GaAlAs, λ 688 η m, 50mW, 2J/cm²), o grupo II recebeu irradiação com LBI infra-vermelho (GaAlAs, λ 785 η m, 50mW, 2J/cm²), e o grupo III não foi irradiado. Após o período experimental de 22 dias, foi realizada análise das peças histológicas. Os resultados mostraram que os grupos irradiados com LBI, principalmente o infra-vermelho, apresentaram melhor resposta tecidual ao cimento Endofill, acelerando o processo de reparo, quando comparados ao grupo controle. Assim, a irradiação com o LBI é indicada como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico quando o cimento Endofill é utilizado.

Sousa et al.⁷³ (2009) analisaram o efeito da fototerapia a laser sobre a atividade secretora de macrófagos ativados por LPS e estimulados por substâncias liberadas a partir de um cimento à base de resina epóxica (AH-Plus) e um cimento de hidróxido de cálcio (Sealapex). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada para os grupos experimentais que não receberam irradiação

(cimentos e controle), sendo similares para todos. Para a análise da secreção do TNF- α os grupos foram divididos de acordo com os cimentos Sealapex e AH Plus, grupo controle, e grupos com e sem irradiação, e os resultados mostraram que os grupos irradiados apresentaram menores quantidades de TNF- α liberado do que os não irradiados, sendo que o grupo do AH Plus não irradiado foi o que apresentou maiores níveis de secreção de TNF- α . Concluíram que substâncias liberadas dos cimentos endodônticos não são citotóxicas para macrófagos, mas interferem na secreção de TNF- α ; além disso, a fototerapia a laser é capaz de diminuir a secreção de TNF- α por macrófagos em contato com os cimentos.

Moriyama et al.⁵⁴ (2009) quantificaram os efeitos da laserterapia em um modelo murino utilizando o gene da luciferase como controle da expressão da iNOS. A modulação pela laserterapia do gene da iNOS expressado num modelo de inflamação aguda induzida por Zimosan foi quantificada usando camundongos transgênicos. Foi utilizada densidade de energia de $5\text{J}/\text{cm}^2$ e os comprimentos de onda de 635,660,690 e 905 ηm foram selecionados no modo contínuo e 905 ηm também foi avaliado no modo pulsado. A idade dos animais foi determinada como modulação adicional da resposta inflamatória e eficácia do LBI para alguns protocolos de tratamento. A laserterapia apresentou diferentes efeitos no processo inflamatório induzido de acordo com o modo e comprimento de onda. Para o comprimento de onda de 905 ηm , a maior regulação do gene da iNOS no modo pulsado sugere um diferente mecanismo na ativação da resposta inflamatória quando comparado com o modo contínuo.

Berbert et al.⁸ (2010) avaliaram a resposta do tecido subcutâneo de camundongos frente ao implante de tubos de polietileno preenchidos com o cimento à base de OZE Endofill e à irradiação do LBI vermelho ou infra-vermelho imediatamente e após 24 horas da implantação do material. Sessenta camundongos foram divididos em 3 grupos: GI, tubo contendo Endofill foi implantado, porém os animais não receberam irradiação; GII, animais receberam o implante e foram irradiados com LBI vermelho (InGaAlP); e GIII, animais receberam o implante e foram irradiados com LBI infra-vermelho (AsGaAl). Após o período experimental de 7 e 30 dias, lâminas histológicas foram confeccionadas e a neoformação de tecido conjuntivo fibroso foi analisada em microscópio de luz convencional e a densidade de mastócitos em microscópio óptico comum. Em relação à formação de fibrose, os resultados mostraram, nos dois períodos experimentais, que o GIII não apresentou diferença no padrão de tecido conjuntivo fibroso quando comparado ao GI; o GII, aos 7 dias, não apresentou melhora no padrão de fibrose, porém, aos 30 dias este padrão foi inferior em relação ao GI no mesmo período. Houve redução do valor médio de mastócitos de forma significativa ($p < 0,05$) aos 7 e 30 dias, quando os grupos irradiados foram comparados aos respectivos controles. A irradiação com LBI após o implante de tubos de polietileno contendo o cimento Endofill não promoveu uma diminuição da fibrose, porém diminuiu significativamente o número de mastócitos independente do período estudado.

Choi et al.¹¹ (2010) estudaram os efeitos biológicos dos lasers de diodo de baixa intensidade sobre fibroblastos do ligamento periodontal de humanos. As

células foram cultivadas e irradiadas com um diodo semiconductor de arseneto-gálio-alumínio (GaAlAs), com o comprimento de onda de 810 nm, saída de energia de 500 mW, modo de onda contínuo e diversas fluências de energia (1,97; 3,94 e 5,91 J/cm²). Uma cultura de fibroblastos sem irradiação foi considerada como controle. Em seguida, as células foram incubadas por 72 horas para realização dos testes MTS e de atividade da fosfatase alcalina. Os resultados mostraram que em todas as fluências de energia da irradiação laser, houve aumento da proliferação de fibroblastos gradualmente para 72 horas sem qualquer diferença significativa em comparação com o controle sobre todo o período ao mesmo tempo. No entanto, o aumento da proliferação celular significativamente maior do que no controle ocorreu entre 24 e 48 horas com as doses de irradiação de 1,97 e 3,94 J/cm² (p<0,05). A maior atividade da fosfatase alcalina foi encontrado em 48 e 72 horas após a irradiação laser com fluência de energia de 3,94 J/cm² (p<0,05). O presente estudo demonstrou que a irradiação com laser de diodo semiconductor GaAlAs promoveu proliferação e diferenciação de fibroblastos do ligamento periodontal de humanos.

O estudo de Hourel et al.³⁰ (2010) teve como objetivo avaliar o efeito da irradiação laser na viabilidade de fibroblastos e produção de NO. Fibroblastos de pele humana (WS1) foram divididos em 3 grupos: células normais, células normais feridas e células diabéticas feridas, sendo que para este último grupo foi utilizado um modelo in vitro de ferida diabética, no qual a monocamada de células foi arranhada com uma pipeta estéril 30 minutos antes da exposição ao laser. Os fibroblastos foram irradiados com um laser de diodo com comprimento de onda

de 830nm e fluência de 5J/cm². Em relação à viabilidade celular, a irradiação não apresentou qualquer efeito significativo, sendo maior que 95% em todos os grupos. Porém, todas as células mostraram um aumento significativo na produção de NO (p<0,01) 15 minutos após a irradiação, o que pode estar relacionado a um efeito fotoquímico, já que ocorreu diminuição da liberação de NO após 1 hora, com diferença significativa quando comparado ao primeiro período.

Oliveira et al.⁵⁷ (2010) estudaram a resposta metabólica de células odontoblastóides (MDPC-23) submetidas a estresse por déficit nutricional (5% de soro fetal bovino – SFB) e irradiação com diferentes doses de laser (1,5; 5 e 19J/cm²). As células foram irradiadas utilizando-se um protótipo laser de diodo infra-vermelho próximo (LASERTable; $\lambda 780 \pm 3$ nm, 25 mW) projetado especificamente para fornecer irradiação uniforme aos poços. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com a concentração de SFB e a dose de laser, sendo G1: 1,5 J/cm² + 5% FBS; G2: 1,5 J/cm² + 10% FBS; G3: 5 J/cm² + 5% FBS; G4: 5 J/cm² + 10% FBS; G5: 19 J/cm² + 5% FBS; G6: 19 J/cm² + 10% FBS; além dos grupos controle. Foram realizadas 3 irradiações consecutivas com intervalo de 24 horas. A análise da resposta metabólica foi realizada pelo teste de MTT, por meio do qual se observou menor viabilidade celular para o grupo 5. A irradiação celular não influenciou na viabilidade quando o meio de cultura foi suplementado com SFB 10%, sem diferença estatisticamente significativa (p>0,05) quando comparado aos respectivos controles. Para os grupos em que se utilizou SFB 5%, a dose de 1,5 J/cm² foi a que resultou em maior número de células viáveis, e a de 19 J/cm² em menor, com diferença estatisticamente

significativa ($p < 0,05$) entre eles. Assim, as células irradiadas com a dose do laser de $1,5 \text{ J/cm}^2$ apresentaram um aumento no metabolismo celular quando submetidos experimentalmente a déficit nutricional induzido (SFB 5%), sendo mais favorável para biomodulação.

Oliveira et al.⁵⁶ (2011) avaliaram o metabolismo de células odontoblastóides expostas à irradiação com LBI. As células foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio suplementado com 2%, 5% (déficit nutricional) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Para irradiação das células foi utilizado um protótipo laser de diodo InGaAsP infra-vermelho próximo (LASERTable; $\lambda 780 \pm 3 \text{ nm}$, 25 mW) com as doses de 2, 4, 10, 15 e 25 J/cm^2 . Para cada grupo experimental (dose de irradiação X suplementação com SFB) foi determinado um grupo controle. As análises celulares foram realizadas após 3 e 72 horas. A viabilidade celular foi maior após 72 horas do que após 3 horas, em todos os grupos. A menor quantidade de células viáveis foi observada quando o meio de cultura foi suplementado com 2% de SFB, enquanto para as concentrações de 5% e 10% não houve diferença entre si ($10\% \text{ SFB} = 5\% \text{ SFB} < 2\% \text{ SFB}$). Alto metabolismo e expressão de proteína total foram observados 72 horas após a irradiação com as doses de 15 e 25 J/cm^2 ($p < 0,005$). Alta atividade da fosfatase alcalina foi obtida com SFB 5% e doses de 2 e 10 J/cm^2 . Para a dose de 25 J/cm^2 , a maior atividade de fosfatase alcalina foi observada com SFB 10%. Os autores concluíram que de acordo com os parâmetros utilizados neste estudo, no qual foram testados diversos protocolos de irradiação em cultura de linhagem odontoblástica submetidas a

diferentes condições de estresse, determinou-se que as doses de 15 e 25 J/cm² foram mais efetivos na bioestimulação de células MDPC-23.

Poyton, Ball⁶¹ (2011) ressaltaram que embora primeiros estudos identificassem a citocromo c oxidase mitocondrial como um fotorreceptor endógeno para fotobiomodulação, seus mecanismos celulares e moleculares fundamentais ainda não estão bem evidentes e que três recentes constatações fornecem importantes dados: NO tem sido associado à fotobiomodulação; uma nova atividade enzimática da citocromo c oxidase tem sido mostrada - a redução do nitrito para NO; e a luz de baixa intensidade aumenta a síntese de NO pela citocromo c oxidase. Além de reexpor a descoberta que o óxido nítrico não é apenas produzido pelas óxido nítrico sintases, mas também por meio do citocromo c oxidase.

Sivieri-Araujo et al.⁷¹ (2011) avaliaram o efeito da irradiação pelo LBI vermelho e infra-vermelho após o implante de tubos de polietileno preenchidos com Endofill em tecido conjuntivo de camundongos. No grupo I (n=20), os animais não foram irradiados; no grupo II (n=20) e III (n=20) a irradiação foi realizada imediatamente e 24 horas após o implante dos tubos de polietileno, sendo utilizado LBI vermelho (InGaAIP - 685 nm, 72J/cm², 58s, 35mW) no grupo II e LBI infra-vermelho (AsGaAl - 830 nm, 70J/cm², 40s, 50mW) no grupo III. Os resultados demonstraram que o LBI foi mais eficiente na redução da resposta inflamatória quando cimentos menos biocompatíveis, como os à base de OZE, são utilizados. Ambos LBI vermelho como o infra-vermelho mostraram capacidade de reparo, no prazo de 7 dias, sendo que o LBI infra-vermelho

apresentou melhores resultados. No período de 30 dias, embora o processo de reparo do tecido tenha ocorrido para todos os grupos, nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos irradiados. Assim, o uso coadjuvante do LBI mostrou-se válido quando um cimento menos biocompatível, como o cimento de OZE é empregado.

CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Importância deve ser dada a estudos relacionados à biocompatibilidade de cimentos endodônticos, em que o efeito irritante causado por tais materiais pode comprometer o sucesso de todo o tratamento endodôntico. Pesquisas nos diferentes níveis têm sido realizadas a fim de melhorar o conhecimento sobre as propriedades biológicas desses materiais, inclusive estudos com cultura de células relacionados à citotoxicidade de cimentos endodônticos, por meio da avaliação da viabilidade celular e da produção de NO também tem sido realizados.

Leonardo et al.⁴⁵ (1997) avaliaram histologicamente o reparo apical e periapical de dentes de cães após biopulpectomia e obturação dos canais radiculares com diferentes cimentos endodônticos contendo hidróxido de cálcio. Oitenta canais radiculares com polpa vital foram instrumentados e obturados na mesma sessão com guta percha e Sealapex, CRCS, Sealer 26 ou Apexit. Após 180 dias foi realizada a análise histopatológica. Os resultados encontrados mostraram que ao utilizar o CRCS ocorreu selamento apical parcial e presença de infiltrado inflamatório moderado. Para o Sealer 26 e Apexit, foi observada ausência de

selamento apical com tecido mineralizado, sendo que o infiltrado inflamatório presente ao usar Sealer 26 foi suave ou ausente enquanto para o Apexit foi de intensidade severa. O Sealapex foi o cimento que permitiu maior deposição de tecido mineralizado na região apical, sendo o único a proporcionar selamento apical completo (37,5% dos casos), além de ausência de infiltrado inflamatório local. Sua biocompatibilidade também foi confirmada nos casos de extravasamento para a região periapical, onde a possível solubilização do material provavelmente levou a deposição de tecido mineralizado e conseqüentemente, reparo.

Tanomaru Filho et al.⁷⁶ (1998) estudaram, por meio de parâmetros histológicos, o potencial irritante de materiais obturadores e sua influência direta no reparo tecidual após tratamento endodôntico em dentes de cães com lesão periapical crônica induzida. Quando o cimento Sealapex foi utilizado, o infiltrado inflamatório presente nos tecidos periapicais foi predominantemente leve (57,9%) quando comparado ao Fill Canal, o qual apresentou uma predominância de infiltrado inflamatório severo (92,9%). No entanto, quando Sealapex foi extruído para a região periapical, houve intensa atividade de macrófagos e formação de áreas mineralizadas próximas ao cimento. A intensa ação irritante do cimento à base de OZE sobre os tecidos apicais e periapicais mostra-se comprovada pela persistência do processo inflamatório após 270 dias da realização da obturação.

Leonardo et al.⁴⁴ (1999) avaliaram a reação tecidual apical e periapical ao AH Plus (cimento à base de resina epóxica) e ao Fill Canal (cimento à base de OZE). Pré-molares de cães, com polpa vital, foram instrumentados e obturados

com guta percha e um dos cimentos avaliados. Após 90 dias foi realizada análise histológica. Os resultados mostraram a presença de moderado infiltrado inflamatório como resposta ao Fill Canal, enquanto os tecidos apicais e periapicais apresentaram ausência de inflamação e de áreas de necrose, parecendo se tornar totalmente mineralizado quando a obturação foi realizada com o AH Plus.

Berbert et al.⁷ (2002) avaliaram a resposta histopatológica do tecido periapical de dentes de cães com periodontite apical crônica. Os canais radiculares foram instrumentados e irrigados com hipoclorito de sódio 5,25% e preenchidos com curativo de demora a base de hidróxido de cálcio (Calen PMCC ou Calasept) por 30 dias. Em seguida, os canais foram obturados com guta percha e Sealapex ou AH Plus. Após 360 dias, os dentes foram preparados histologicamente, e o reparo dos tecidos apical e periapical foram analisados em microscópio. Os resultados encontrados mostraram que o Sealapex apresentou o melhor reparo apical do que o AH Plus, principalmente quando utilizou-se como medicação intracanal a pasta Calen com PMCC.

Mendes et al.⁵² (2003) avaliaram o efeito de dois cimentos à base de OZE sobre a atividade de macrófagos. Para verificação da citotoxicidade dos cimentos Pulp Canal Sealer EWT (PCS EWT) e Endofill frescos, esses foram inseridos em capilares de vidro de 2 mm de diâmetro os quais foram colocados em contato com as culturas de macrófagos de camundongos por 2, 48 e 72 horas, sendo que as células apresentaram viabilidade acima de 95% mesmo após 72 horas em contato com os cimentos. A produção de NO foi verificada por meio da reação de Griess, sendo utilizado um tubo vazio como controle. A produção de NO por macrófagos

foi igualmente inibida por ambos os cimentos, sem interferência do tempo de espatulação e da ativação por IFN- γ . Assim, os cimentos não afetaram a viabilidade dos macrófagos, no entanto, a produção de NO em resposta a ativação com IFN- γ foi diminuída, sendo que amostras frescas e após presa tiveram atividades inibitórias similares.

Silva et al.⁶⁸ (2005) avaliaram a liberação de NO por macrófagos peritoneais de camundongos após o contato com cimentos endodônticos. Após estabelecer a concentração adequada para cada material, a produção de NO foi dosada pelo método de Griess a partir do nitrito acumulado no sobrenadante das culturas celulares. As células estimuladas com os cimentos endodônticos apresentaram menor quantidade de NO liberado quando comparadas ao controle positivo LPS ($p < 0,001$), sendo a produção classificada em ordem crescente: Sealapex > Endofill = Polifill > LPS.

A citotoxicidade de dois cimentos endodônticos foi avaliada por Queiroz et al.⁶² (2005) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Após 48 horas de contato da cultura celular com a suspensão dos cimentos foi feita a análise da produção de NO por meio da reação de Griess e a leitura realizada em um leitor ELISA. Verificou-se que os macrófagos em contato com concentrações similares da suspensão dos cimentos, produziram menores quantidades de NO em contato com Endofill, em relação ao Sealer 26, o qual não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle positivo (células + lipopolissacarídeo/LPS). Os autores concluíram que usando a técnica de cultura de células, macrófagos peritoneais de camundongos produziram quantidades

variadas de NO em contato com os cimentos endodônticos Sealer 26 e Endofill. Considerando que células em condições de agressão ou estresse produzem grandes quantidades de NO, o cimento Sealer 26 mostrou maior toxicidade que o Endofill.

Queiroz et al.⁶³ (2006) avaliaram a citotoxicidade de cimentos endodônticos em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos quanto à produção de óxido nítrico. Os materiais Topseal e Sealapex foram espatulados de acordo com as recomendações do fabricante e após completarem a reação de presa foram fracionados e diluídos em polietilenoglicol 400 com auxílio de um sonicador à concentração de 18µg/ml. Após 48 horas de contato da solução dos cimentos com a cultura celular, a produção de NO foi verificada por meio da reação de Griess. Os resultados demonstraram que a liberação de NO pelos macrófagos expostos ao cimento Topseal foi maior quando comparado ao Sealapex, com diferença estatisticamente significativa ($\alpha < 0,05$). Assim, para avaliação da agressão celular em resposta à produção de NO, o Sealapex apresentou reduzida citotoxicidade.

Eldeniz et al.¹⁶ (2007) avaliaram o efeito citotóxico de cimentos endodônticos em fibroblastos gengivais humanos (FGH) e fibroblastos de camundongos (linhagem L929). Os materiais foram espatulados de acordo com as recomendações do fabricante e inseridos em moldes de teflon. Após o endurecimento, os espécimes foram divididos em dois grupos, onde 4 amostras foram imersas imediatamente em meio de cultura (espécimes frescos) e outras 4 foram colocadas em placa de Petri e mantidas em câmara úmida a 37°C, sendo

que após 7 dias também foram inseridas em meio de cultura (espécimes envelhecidos). Os eloatos não diluídos foram utilizados para realização do teste de viabilidade celular. Epiphany, Endo-Rez, Apexit e Acroseal foram significativamente mais tóxicos que os outros cimentos ($P < 0,05$). AH Plus não exerceu qualquer efeito citotóxico sobre FGH e o eloato referente aos espécimes envelhecidos pareceu induzir a proliferação celular. No entanto, apresentou efeito altamente citotóxico quando o eloato dos espécimes frescos foi colocado em contato com fibroblastos L929, reduzindo a citotoxicidade quando as amostras envelhecidas foram utilizadas. RoekoSeal e GuttaFlow demonstraram citotoxicidade suave. GuttaFlow foi ligeiramente mais citotóxico para ambas as culturas, especialmente, quando testado fresco. Os resultados levaram a conclusão de que os cimentos apresentam citotoxicidade variada, o que advém da diferente composição de cada um.

Lee et al.⁴² (2007) avaliaram a expressão de NO e da iNOS por macrófagos RAW 264.7 expostos à cimentos endodônticos e LPS. Encontraram que extratos dos cimentos N2 Universal (à base de OZE), Sealapex (à base de hidróxido de cálcio) e AH 26 (à base de resina epóxica) suprimiram a indução da iNOS e inibiram a produção de NO, sendo esta dose-dependente sem evidências de efeitos citotóxicos.

Gomes Filho et al.²⁰ (2008) avaliaram a reação tecidual à dois cimentos à base de hidróxido de cálcio, Acrosel e Sealapex (nova formulação). Tubos de dentina preenchidos com os materiais e tubos vazios (controle) foram implantados no tecido conjuntivo do dorso de ratos. Sete e trinta dias após implantação, os

animais foram sacrificados e os espécimes preparados para análise histológica. Os tubos de dentina em que ocorreu desmineralização foram usados para avaliar a reação inflamatória e nos tubos não desmineralizados foi observada a indução de mineralização pelos cimentos. Os resultados demonstraram que ambos os cimentos causaram reação inflamatória suave ou moderada aos 7 dias, porém houve diminuição da inflamação aos 30 dias e a cápsula fibrosa formada ao redor da abertura dos tubos apresentava-se fina. O Sealapex foi o único que levou a mineralização do tecido subcutâneo dos ratos. Apesar da reação tecidual aos dois cimentos ser similar, são necessárias pesquisas com outros modelos de animais para verificar se o Acroseal pode causar risco ao selamento biológico de ápices radiculares humanos.

Leonardo et al.⁴³ (2008) estudaram a biocompatibilidade do RoekoSeal e AH Plus aos tecidos periapicais de cães. Trinta e dois pré-molares tiveram a polpa radicular removida com uma lima hedstroen # 25, e a camada de cimento apical perfurada com lima tipo kerr #15, # 20 e # 25, para padronização do forame apical. Foi realizado preparo biomecânico no comprimento de trabalho até lima tipo Kerr #60, e os canais foram obturados pela técnica de condensação lateral. Após o período experimental de 90 dias, os animais sofreram eutanásia, removeram-se os blocos contendo osso e os elementos dentários, e os espécimes foram preparados para análise histopatológica. No grupo 1 (RoekoSeal Auto Mix), foi observada deposição de tecido mineralizado, com completa formação de tecido mineralizado apical em 43,8% dos dentes e selamento parcial em 56,2%. No grupo 2 (AH Plus) houve completa formação

de tecido apical mineralizado em 12,5% das amostras, selamento parcial em 75% e ausência de selamento em 12,5%. Não houve diferença entre os grupos em relação ao infiltrado inflamatório; espessura do ligamento periodontal e reabsorção de dentina, cimento ou osso ($p>0,05$). De acordo com os parâmetros do presente estudo, o RoekoSeal apresentou respostas biológicas satisfatórias quando comparado aos efeitos do AH Plus.

Scarparo et al.⁶⁶ (2009) avaliaram a reação do tecido subcutâneo de ratos frente a cimentos endodônticos. Tubos de polietileno foram preenchidos com Endorez (à base de resina metacrilato), AH Plus (à base de resina epóxica) e Endofill (à base de OZE) e implantados em ratos. Após 7, 30 e 60 dias, foi realizada a análise histológica dos espécimes. Os resultados mostraram diminuição do número de células inflamatórias e aumento de fibras ao longo dos períodos experimentais quando o AH Plus foi utilizado. Os cimentos Endorez e Endofill mostraram inflamação mais intensa e de longa duração, com a presença abundante de células inflamatórias. Na presença Endofill a condensação fibrosa não foi obtida após 7 dias, e nos outros períodos tornou-se mais evidente, embora fina ou desorganizada. Somente o grupo controle, no qual foi implantado um tubo vazio, mostrou redução significativa nas características da reação inflamatória aos 60 dias. Valores reduzidos de formação de abscesso foram encontrados durante todo o experimento. O presente estudo indicou uma tendência dos cimentos à base de resina metacrilato e de OZE apresentarem maior potencial para irritação dos tecidos, no entanto os autores concluem que nenhum dos materiais testados

ofereceu as características ideais de biocompatibilidade desejável em um cimento endodôntico.

Gomes Filho et al.²² (2009) investigaram os efeitos dos materiais Endo CPM Sealer, Sealapex (nova formulação) e MTA Angelus na viabilidade de fibroblastos de camundongos (L929). Os materiais foram inseridos em tubos de polietileno e estes colocados em contato com a cultura celular. Após 24 horas de incubação, o teste MTT para verificação da viabilidade celular foi realizado. A análise estatística dos dados não mostrou diferença significativa entre os três cimentos, os quais não foram citotóxicos comparados com o grupo controle.

Al-Hiyasat et al.² (2010) verificaram os efeitos citotóxicos de quatro cimentos endodônticos: EndoREZ, Epiphany, Metaseal e AH Plus. Utilizaram eloatos dos materiais em contato com fibroblastos C 3T3 de camundongos Balb por 48 horas, e após esse período a citotoxicidade foi determinada por meio do teste de MTT. Os resultados encontrados mostraram que todos os cimentos apresentaram citotoxicidade em diferentes graus, sendo que o AH Plus apresentou baixo efeito citotóxico, seguido do EndoRez (moderado), Epiphany (altamente citotóxico) e Metaseal com atividade citotóxica severa. Os eloatos foram diluídos (1:10) e somente citotoxicidade severa ainda foi observada para o Metaseal, em contraste com os eloatos diluídos dos outros cimentos que apresentaram inibição da viabilidade celular dependente da concentração do eloato. Assim, o AH Plus pode ser considerado o mais biocompatível entre os cimentos estudados, já que apresentou maior viabilidade dos fibroblastos independente da diluição do seu eloato.

Suzuki et al.⁷⁴ (2010) estudaram a resposta do tecido periapical de dentes de cães cujos canais radiculares foram obturados em única sessão com guta percha e um cimento endodôntico à base de OZE, o Endométhasone, aquém (grupo 1) ou além (grupo 2) do forame apical. Após 90 dias do tratamento realizado, as raízes e o tecido circundante foram obtidos individualmente e preparados para análise histomorfológica. Os resultados mostraram predominância de infiltrado inflamatório crônico leve no grupo 1, porém severo no grupo 2. Assim, a ausência de completo fechamento do forame principal e a presença de infiltrado inflamatório crônico em todos os espécimes, principalmente de intensidade elevada no grupo 2 onde ocorreu sobreobturação, demonstrou que o Endométhasone não promove uma reparação endodôntica ideal. No entanto, a presença em alguns espécimes de tecido conjuntivo fibroso circundando parcialmente fragmentos do cimento sugere que a completa encapsulação de partículas do material pode ocorrer após longos períodos, reduzindo o infiltrado inflamatório periapical.

Gomes-Filho et al.²¹ (2010) estudaram a reação do tecido conjuntivo de ratos ao implante de tubos de dentina preenchidos com mineral trióxido agregado (MTA), Sealapex (nova formulação) e a combinação de MTA com Sealapex, e tubos vazios como controle. A análise histológica foi realizada nos períodos de 7 e 30 dias, sendo que para ambos, os resultados para os materiais estudados foram similares. Após 7 dias, todos os grupos experimentais apresentaram reação inflamatória crônica moderada, a qual tornou-se suave aos 30 dias. O efeito desses materiais endodônticos na viabilidade de fibroblastos de

camundongo (L929) também foi avaliado. Para tanto, tubos de polietileno preenchidos com os materiais foram colocados em contato com a cultura de células em placas de 24 compartimentos, e após 24 horas realizado o teste de MTT. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos experimentais e controle, e todos os materiais não inibiram a viabilidade celular.

Silveira et al.⁷⁰ (2011) investigaram a biocompatibilidade de cimentos endodônticos com diferentes composições químicas em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Sessenta animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o cimento: Epiphany, AH Plus, Pulp Canal Sealer ou Sealapex (nova formulação). Tubos de polietileno preenchidos com os materiais foram inseridos no tecido conjuntivo e removidos após 7, 15 e 30 dias para análise histológica. Esta considerou: espessura da cápsula fibrosa, severidade da reação inflamatória e presença de células gigantes. O Sealapex induziu a menor resposta inflamatória em todos os períodos de avaliação, sendo moderada após 7 dias, com redução nos demais períodos avaliados. AH Plus mostrou uma fina cápsula fibrosa aos 7 dias, semelhante ao grupo controle, e reação inflamatória leve aos 15 e 30 dias. Pulp Canal Sealer apresentou reação inflamatória leve após 7 dias, porém aos 15 dias teve um aumento tornando-se moderada aos 30 dias, estando presentes células plasmáticas e macrófagos. Para o Epiphany foi observada reação inflamatória moderada a severa nos 3 períodos avaliados. Os resultados mostraram que os cimentos estudados apresentam compatibilidade biológica aceitável após 30 dias, exceto o Pulp Canal Sealer que não apresentou diminuição da reação inflamatória ao longo do tempo.

Farhad et al.¹⁷ (2011) verificaram a biocompatibilidade de cimentos endodônticos em contato com tecido subcutâneo de ratos. Tubos de polietileno vazios e preenchidos com AH Plus, Epiphany e Cimento de Grossman foram inseridos no dorso dos animais. Os grupos foram divididos de acordo com 3 períodos experimentais: 15, 30 e 60 dias. Após avaliação dos cortes histológicos de cada região, para todos os grupos, a resposta inflamatória tecidual observada variou de aguda, para o período de 15 dias, até crônica, para 30 e 60 dias e o infiltrado de células inflamatórias diminuiu ao longo do tempo. Os cimentos AH Plus e Epiphany apresentaram reação tecidual inflamatória semelhante, sendo moderada aos 15 dias e suave aos 30 e 60 dias, com diferença significativa entre o primeiro e último períodos avaliados. Já o cimento Grossman, em todos os períodos estudados, apresentou resposta inflamatória severa, sendo significativamente diferente dos outros grupos, seguido do AH Plus, Epiphany e controle, que não apresentaram diferença significativa entre si.

Silva-Herzog et al.⁶⁹ (2011) avaliaram a resposta inflamatória tecidual para os cimentos RoekoSeal, AH Plus e Sealapex (nova formulação) utilizando um método físico-químico para quantificação do aumento da permeabilidade vascular e análise histopatológica. Os cimentos, solução salina (controle negativo) e Cloropercha (controle positivo) foram injetados em cinco sítios locais demarcados aleatoriamente em cada rato, os quais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos de acordo com os períodos de avaliação (1, 3, 7 e 14 dias). Os resultados encontrados mostraram que em 14 dias o Sealapex produziu significativamente mais exsudato inflamatório que o AH Plus e Roeko-Seal ($p < 0,05$), porém entre

esses não houve diferença significativa ($p>0,05$). O Sealapex (nova formulação) foi o cimento mais irritante, produzindo inflamação grave com a presença de células gigantes multinucleadas, enquanto o Roeko-Seal foi o material mais biocompatível, produzindo a menor quantidade de exsudato inflamatório.

Karapınar-Kazandag et al.³⁶ (2011) investigaram o efeito citotóxico de diferentes cimentos em contato com linhagem de fibroblastos L929 e com células humanas pulpares. Foram confeccionados espécimes de cada material, os quais foram inseridos em meio de cultura e incubados a 37°C e 5% CO₂. Após os períodos de 1, 4 e 7 dias, os elos dos cimentos foram diluídos a 50% e 25% em meio de cultura e utilizados para a realização do teste de viabilidade celular MTS. Os resultados mostraram que os cimentos endodônticos apresentam diferente citotoxicidade dependendo de sua composição química, sendo que para o cimento AH Plus, a citotoxicidade observada foi mínima ou ausente, para os dois tipos celulares e condições estudadas.

PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da laserterapia sobre a viabilidade de macrófagos e sua produção de óxido nítrico frente aos cimentos endodônticos Endofill, AH Plus e Sealapex.

MATERIAL E MÉTODO

- CULTURA DE CÉLULAS

Para a realização do estudo foi utilizada a linhagem celular imortalizada de macrófagos de camundongo RAW 264.7 (ATCC TIB-71) (Figura1). Os macrófagos foram cultivados em garrafas plásticas para cultivo celular com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium, SIGMA Chemical Co, St Louis, MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA).

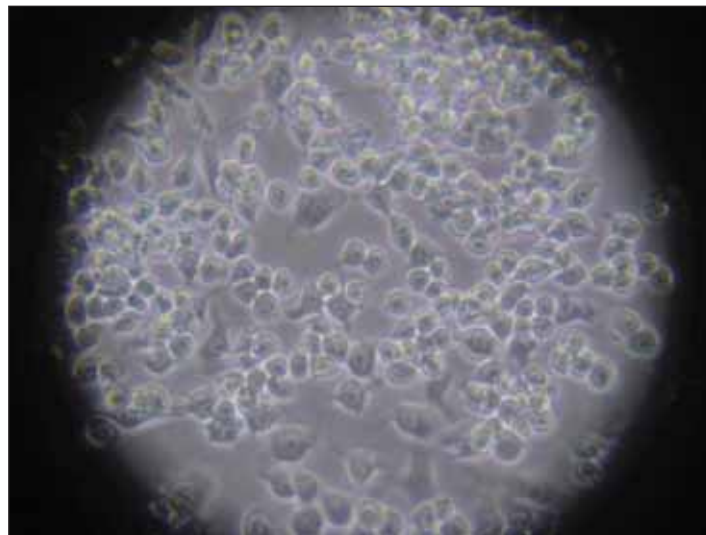


FIGURA 1 - Macrófagos murinos (RAW 264.7), em microscópio de luz invertida Nikon Eclipse TS100, com aumento de 40x.

Fonte: Arquivo pessoal de Fernanda Gonçalves Basso. (LPEB - Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais) Novembro.2011

As células foram mantidas em estufa a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). As substituições do meio de cultura foram realizadas a cada 2 dias e o crescimento celular foi avaliado a cada 24 horas. As células foram subcultivadas a partir da obtenção de subconfluência, até obter-se o número de células adequado para a realização da pesquisa.

Após a obtenção do número de células adequado para cada experimento (5×10^5 células/ml), as células foram cultivadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço), utilizando-se para isto DMEM complementado com 5% de SFB. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, e após esse período, o meio de cultura foi substituído por DMEM sem SFB, para evitar a possível interação dos componentes do SFB com os cimentos endodônticos.

Em seguida, os cimentos endodônticos foram adicionados de acordo com as concentrações pré-determinadas, e as células foram irradiadas com laser de baixa intensidade, de acordo com a dose determinada no estudo piloto. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂.

Após 24 horas da realização dos protocolos experimentais, foi avaliado o efeito da laserterapia de baixa intensidade sobre essas células, na presença ou ausência dos cimentos endodônticos.

- IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Para irradiação das células foi utilizado um protótipo laser infra-vermelho próximo (LASERTable; $\lambda 780 \pm 3 \text{ nm}$, 25 mW)^{5,56,57} desenvolvido pelo Grupo de Óptica do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo(USP) (Figura 2).

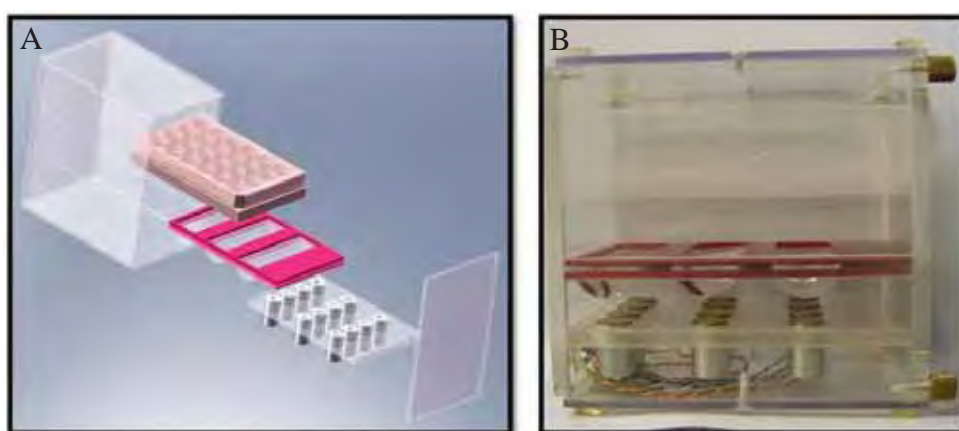


FIGURA 2 – **A** - Figura esquemática do dispositivo de irradiação. Fonte: Arquivo Instituto de Física de São Carlos – USP. **B** - Figura da LASERTable.

Este dispositivo é composto por 12 diodos do tipo InGaAsP (Arseneto de índio gálio e fosfato) posicionados na LASERTable para irradiar individualmente cada um dos 12 poços existentes em uma placa de cultura celular de 24 compartimentos (Figura 3).

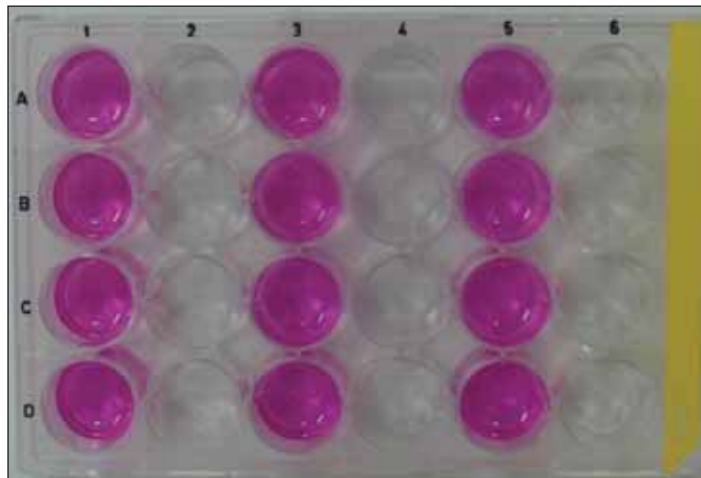


FIGURA 3 - Distribuição da cultura celular em placa de 24 poços de acordo com a posição dos diodos da Lasertable.

Para determinar qual a dose utilizada, foi realizado inicialmente um estudo piloto avaliando os efeitos de diferentes irradiações sobre as células sem adição dos cimentos. Devido ao comprimento de onda e a potência da LASERtable serem fixos, o protótipo era ajustado para que as células fossem irradiadas por 80, 240 e 400 segundos, obtendo-se assim as doses de $1\text{J}/\text{cm}^2$, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$, respectivamente.

A dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$, pré-determinada no estudo piloto, foi utilizada para a irradiação realizada após a adição da suspensão dos cimentos à cultura de macrófagos, sendo que a metodologia está descrita no item referente aos cimentos endodônticos. As células dos grupos controle receberam o mesmo tratamento que as dos grupos experimentais (Um grupo controle para cada grupo experimental).

- AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para determinar a viabilidade celular foi empregada a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida de viabilidade celular. Esta metodologia baseia-se na capacidade que células viáveis têm de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan, insolúveis em água e de cor púrpura, acumulando-se nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular⁵⁵ (Figura 4).

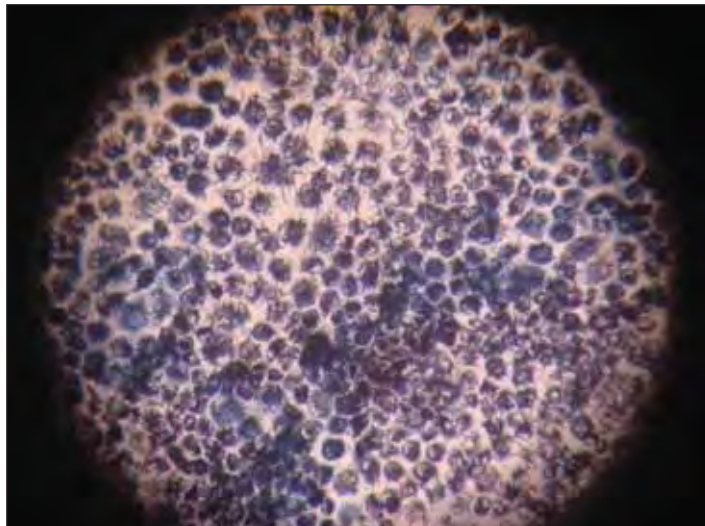


FIGURA 4 - Macrófagos murinos (RAW 264.7), em microscópio de luz invertida Nikon Eclipse TS100, com aumento de 40x, após realização de teste de viabilidade celular.

Fonte: Arquivo pessoal de Fernanda Gonçalves Basso. (LPEB - Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais) Novembro.2011

Após 24 horas de contato dos macrófagos com os cimentos endodônticos³⁴, o sobrenadante foi removido, foram adicionados 900uL de DMEM sem SFB e 100µl da solução de MTT (5mg/ml em solução tampão fosfato-salina) e as células foram incubadas por 4 horas em estufa 5% de CO₂, 95% de umidade à 37°C . Após este período adicionou-se 600µL de isopropanol para diluição dos cristais de formazan. As densidades ópticas das soluções foram medidas por espectrofotômetro com filtro de 570 nm de comprimento de onda (ThermoPlate, Nashan District, Shenzhen, China).

- CIMENTOS ENDODÔNTICOS:

Foram utilizados os seguintes cimentos endodônticos:

- a) Endofill (Dentsply HERO, Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil)
- b) AH Plus (Dentsply HERO, Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis-RJ, Brasil)
- c) Sealapex (Sybron Kerr, Indústria e Comércio Ltda, Guarulhos-SP, Brasil)

Composição dos cimentos endodônticos, segundo os fabricantes:

a) Endofill (Dentsply HERO)

Pó: óxido de zinco, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário e borato de sódio

Líquido: eugenol e óleo de amêndoas doces

b) AH Plus (Dentsply HERO)

Pasta A: resina epoxi de Bisfenol-A, resina epoxi de Bisfenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de óxido de ferro.

Pasta B: dibenzildiamina, amina adamantada, TDC-diamina, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óleo de silicone.

c) Sealapex (Sybron Kerr) – Nova Formulação

Pasta Base: óxido de cálcio, fosfato tricálcio, benzeno butil sulfanilamida, óxido de zinco, água destilada

Pasta Catalisadora: trióxido de bismuto, resina de salicilato de metila, salicilato de isobutil, sílica pulverizada, dióxido de titânio, pigmento

Preparo e Obtenção das soluções dos cimentos:

Foi realizado um estudo piloto para definir qual a concentração das suspensões dos cimentos diluídas seria colocada em contato com a cultura celular e, após realização do teste de MTT, determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀), segundo o preconizado pela International Standard Organization (ISO), Norma ISO nº10993³³, a qual foi selecionada para a realização dos testes propostos. Para tanto, foram preparadas diluições seriadas de acordo com cada suspensão de cimento endodôntico. Para o cimento Endofill, foram utilizados

60 μ L de eugenol (volume referente ao recomendado pelo fabricante, três gotas) e 256 miligramas (mg) de pó, quantidade determinada pela média de cinco espatulações cuja proporção ideal formasse um fio de 2cm após verter a espátula metálica nº24 contendo o volume espatulado e, a partir da qual, era obtida a diferença entre a massa inicial e a final em mg⁶, pesadas em uma balança de precisão (Metler AJ150, da Metler-Toledo AG, USA).

Para os cimentos Sealapex e AH Plus, por serem cimentos do tipo pasta/pasta, foram colocadas partes iguais de pasta base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro (3 cm de cada) e com auxílio de uma espátula metálica nº24 foram incorporadas uma à outra até obtenção de uma mistura homogênea.

Após espatulação, 90 mg dos cimentos foram pesadas em uma balança de precisão, diluídas em 5 mililitros de Polietilenoglicol 400 com o auxílio de um sonicador (Sonic & Materials, Vibra Cell, Sonic & Materials Inc. Danbury, CT, USA) e a suspensão dos cimentos foi autoclavada por 20 minutos à 121°C^{60,62} (Figura 5). A partir da concentração inicial da suspensão de cada cimento (18mg/ml), foram realizadas diversas diluições (diluição fracionada) em DMEM⁶². As soluções dos cimentos diluídas foram colocadas em contato com a cultura de macrófagos de camundongos e, através do teste de MTT foi determinada a concentração de inibição (IC₅₀) a qual foi selecionada para a realização dos testes propostos.

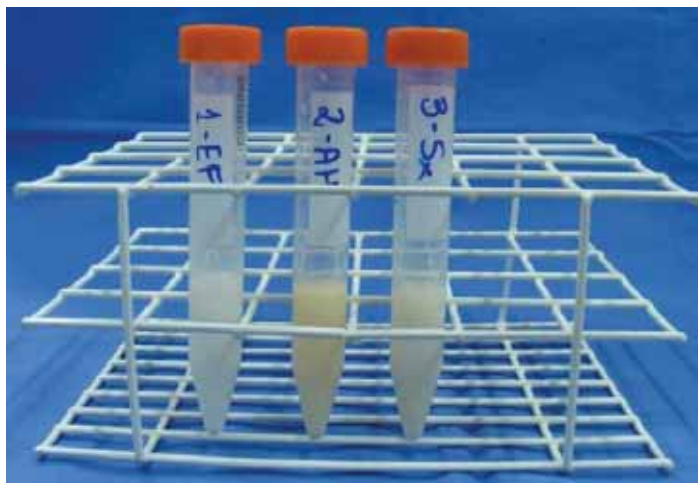


FIGURA 5 - Suspensão dos cimentos endodônticos Endofill, AH Plus e Sealapex na concentração inicial de 18 $\mu\text{g/ml}$.

- GRUPOS DE ESTUDO

Os grupos foram distribuídos de acordo com os resultados de cada piloto conforme o demonstrado no Quadro 1, com e sem irradiação pelo LBI infravermelho. Para o grupo controle negativo, as células foram mantidas somente em meio de cultura celular DMEM. Para o grupo controle positivo, foi adicionado à cultura celular lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$, por ser um potente estimulador de macrófagos^{60,62,77}.

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais e controles

<i>Grupos</i>	<i>Cimentos Endodônticos</i>	<i>Irradiação</i>
G1 (controle negativo)	-	-
G2 (controle negativo irradiado)	-	+
G3 (controle positivo-LPS)	-	-
G4 (controle positivo irradiado -LPS)	-	+
G5	Endofill	-
G6	Endofill	+
G7	Sealapex	-
G8	Sealapex	+
G9	AHPlus	-
G10	AHPlus	+

- DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células, por meio da reação de diazotização 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 ml²⁴.

Após 24 horas da adição das soluções dos cimentos endodônticos sobre a cultura de macrófagos e realização dos protocolos de irradiação, alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células foram transferidas com auxílio de uma pipeta para uma placa de cultura de células de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) e acrescentou-se igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos 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 $\mu\text{mols de nitrito}/5 \times 10^5$ células.

- ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 em triplicata utilizando seis amostras por grupo experimental. Os gráficos foram confeccionados com o auxílio do programa Microcal Origin 7.0.

RESULTADO

A dose de irradiação utilizada no presente estudo foi determinada por meio de um estudo piloto no qual a viabilidade celular foi verificada após a aplicação do laser sobre a cultura de macrófagos, nas doses de $1\text{J}/\text{cm}^2$, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$. Os resultados encontrados estão representados na Figura 6, sendo que a dose selecionada para a realização dos demais testes foi a de $3\text{J}/\text{cm}^2$, pois apresentou elevada quantidade de células viáveis.

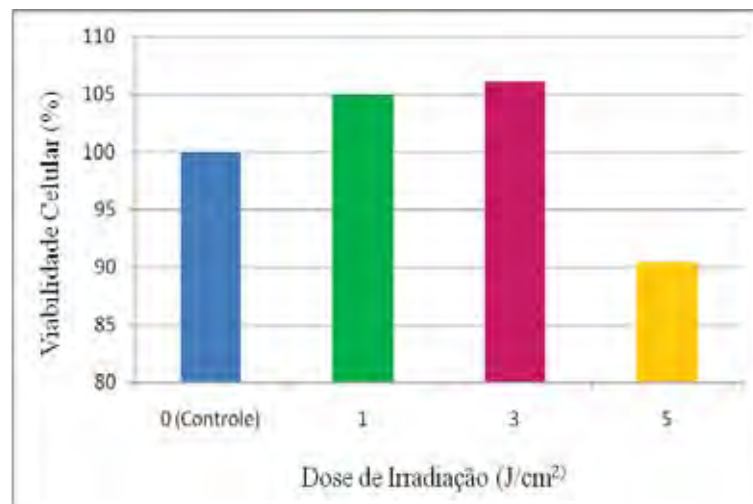


FIGURA 6 - Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na ausência (grupo controle) e presença de diferentes doses de irradiação.

A concentração adequada para cada cimento endodôntico foi determinada por meio da realização do teste MTT, sendo selecionadas as concentrações que determinaram 50% de células viáveis após o contato com cada material, as quais estão relacionadas na Tabela 1. Os resultados demonstraram que cada cimento endodôntico promoveu a viabilidade de 50% de células em diferentes concentrações (Figura 7). O Endofill foi o material que apresentou maior

citotoxicidade, já que para a mesma porcentagem de viabilidade celular (IC_{50}), necessitou de maior diluição, ou seja, uma menor concentração (6 $\mu\text{g/ml}$). Por outro lado, o Sealapex apresentou menor efeito citotóxico, pois sua concentração foi a maior (75 $\mu\text{g/ml}$). Já o AH Plus representou citotoxicidade intermediária (30 $\mu\text{g/ml}$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações de IC_{50} para os cimentos Endofill, AH Plus e Sealapex

<i>Cimentos endodônticos</i>	<i>Concentração de Inibição (IC_{50})</i>
Endofill	6 $\mu\text{g/ml}$
AH Plus	30 $\mu\text{g/ml}$
Sealapex	75 $\mu\text{g/ml}$

- VIABILIDADE CELULAR

As médias e desvios padrão das porcentagens de viabilidade celular de macrófagos expostos aos cimentos Endofill (6 $\mu\text{g/ml}$), AH Plus (30 $\mu\text{g/ml}$) e Sealapex (75 $\mu\text{g/ml}$) ou ao LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), com aplicação ou não do laser de baixa intensidade (3J/cm²) e na ausência de estímulo estão apresentados na Figura 7 e Tabela 2.

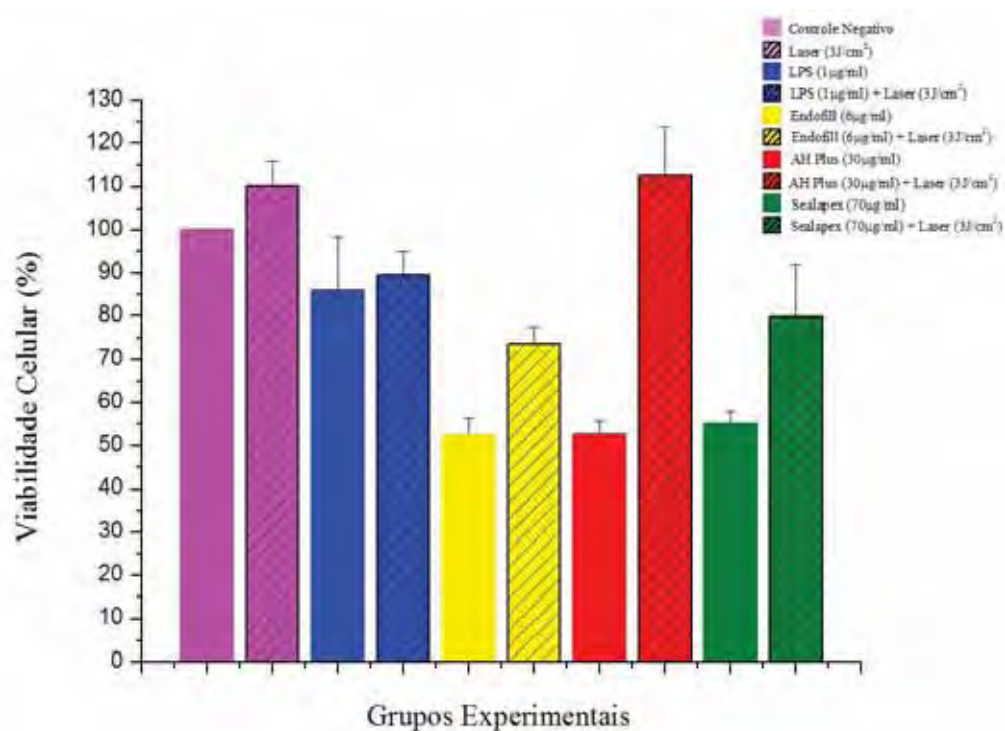


FIGURA 7 - Viabilidade de macrófagos RAW 264.7 em presença de diferentes cimentos endodônticos, em suas respectivas concentrações, LPS em 1 µg/ml ou somente meio de cultura DMEM, com e sem laser de baixa intensidade na dose de 3J/cm².

Tabela 2 - Médias e desvio padrão dos valores de viabilidade celular (%) em presença de diferentes cimentos endodônticos (Endofill, AH Plus e Sealapex) e laser de baixa intensidade

<i>Grupos Experimentais</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
Controle negativo	100 ^a	6,06
Laser	109,54 ^a	6,09
Controle positivo-LPS	86,06 ^b	12,29
LPS + laser	89,58 ^b	5,31
Endofill	52,58 ^c	3,68
Endofill + laser	73,56 ^b	4,14
AH Plus	52,71 ^c	2,86
AH Plus + laser	112,59 ^a	11,32
Sealapex	55,16 ^c	2,8
Sealapex + laser	79,76 ^b	12,32

Comparação entre grupos: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

- PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

As médias e desvios padrão dos valores de liberação de óxido nítrico (NO), em micromols, por macrófagos expostos aos cimentos Endofill (6 µg/ml), AH Plus (30 µg/ml) e Sealapex (75 µg/ml) ou ao LPS (1 µg/ml), com ou sem aplicação do laser de baixa intensidade (3J/cm²) e na ausência de estímulo, estão apresentados na Figura 8 e Tabela 3.

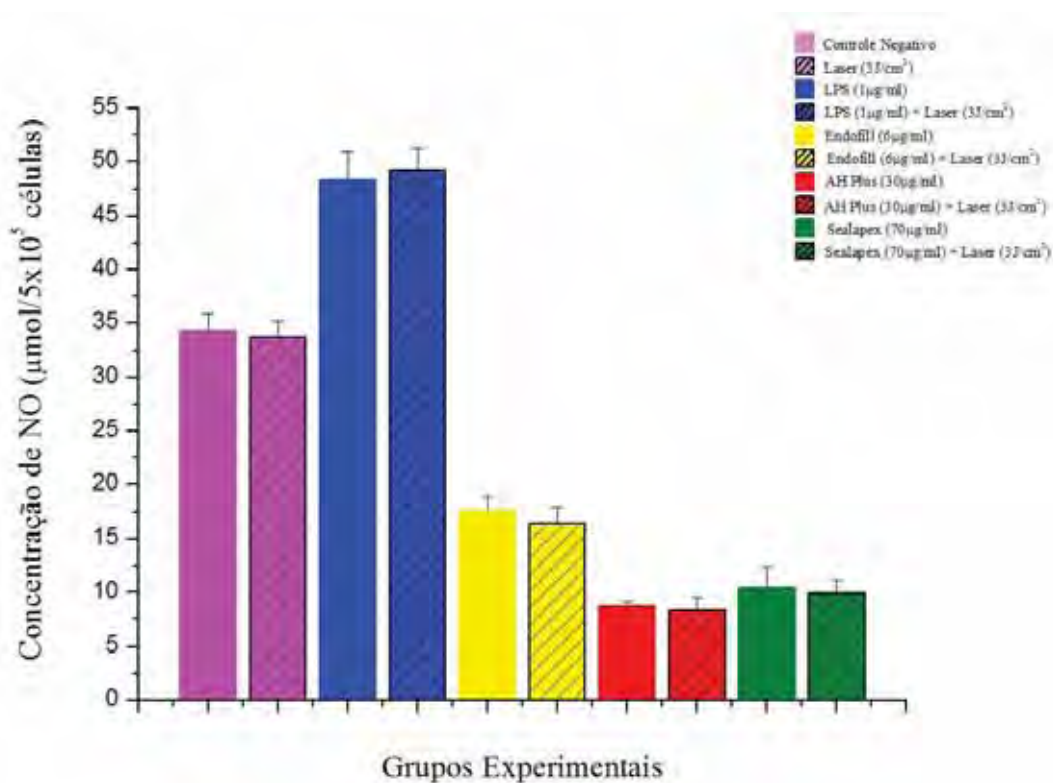


FIGURA 8 - Produção de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 em presença de diferentes cimentos endodônticos, em suas respectivas concentrações, LPS em 1 µg/ml ou somente meio de cultura DMEM, com e sem laser de baixa intensidade na dose de 3J/cm².

Tabela 3 - Médias e desvio padrão dos valores de liberação de NO ($\mu\text{mol}/5 \times 10^5$ células) por macrófagos expostos a diferentes cimentos endodônticos (Endofill, AH Plus e Sealapex) e laser de baixa intensidade

<i>Grupos Experimentais</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
Controle negativo	34,32 ^b	1,53
Laser	33,71 ^b	1,48
Controle positivo-LPS	48,31 ^a	2,65
LPS + laser	49,25 ^a	2,01
Endofill	17,52 ^c	1,44
Endofill + laser	16,37 ^c	1,55
AH Plus	8,65 ^d	0,54
AH Plus + laser	8,38 ^d	1,12
Sealapex	10,37 ^d	2,06
Sealapex + laser	10,06 ^d	1,19

Comparação entre grupos: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Ao se correlacionar os dados obtidos nos dois testes realizados, tem-se que a viabilidade celular no grupo onde as células foram expostas ao LPS diminuiu em relação às células sem estímulo, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto, a produção de NO foi significativamente maior quando LPS foi adicionado à cultura de macrófagos quando comparado às células na ausência de LPS ($p < 0,001$).

Com relação ao efeito da irradiação com o laser de baixa intensidade, nossos achados demonstraram que todos os grupos estudados, quando submetidos a esta, apresentaram aumento de viabilidade celular.

Na ausência de cimentos endodônticos, quando as células receberam irradiação, apresentaram aumento da viabilidade celular quando comparadas às células em contato somente com meio de cultura, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Nas células onde se adicionou LPS, o

LBI também promoveu aumento da viabilidade de macrófagos da linhagem RAW 264.7, porém, de maneira discreta sem demonstrar diferença em relação ao grupo controle positivo ($p>0,05$).

Por outro lado, quando o LBI foi aplicado sobre os macrófagos expostos aos materiais obturadores Endofill, Sealapex e AH Plus houve aumento da viabilidade celular em 39,9%, 44,5% e 113,5%, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos que receberam os cimentos sem irradiação ($p<0,001$).

Nos grupos controle, o LBI não teve influência na liberação de NO, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as células em D-MEM irradiadas ou não, ou entre as células estimuladas com LPS irradiadas ou não, quando comparados entre si ($p>0,05$).

Quando o LBI foi aplicado sobre as células, ambos os grupos controles negativo e positivo demonstraram pequeno efeito da irradiação no aumento da viabilidade celular, sem interferir na liberação de NO, não apresentando diferença estatística significativa para as duas análises ($p>0,05$).

Os resultados alcançados nos grupos onde as células foram expostas aos cimentos e submetidas à irradiação com o laser de baixa intensidade, não demonstraram diferença entre si individualmente, ou seja, a quantidade de NO presente no sobrenadante das culturas foi semelhante para cada material com e sem irradiação, sem diferença estatística entre eles ($p>0,05$).

DISCUSSÃO

A obturação do sistema de canais radiculares é uma das etapas operatórias do tratamento endodôntico na qual são utilizados diferentes tipos de materiais, sendo que a associação de materiais em estado sólido, principalmente a gutta percha, com os materiais em estado plástico, representados pelos cimentos endodônticos, é utilizada mundialmente. Esses materiais devem apresentar propriedades biológicas adequadas e condições que favoreçam o reparo dos tecidos periapicais, evitando proporcionar uma agressão local, já que a diminuição dos índices de sucesso do tratamento dos canais radiculares também pode ser atribuída à extrusão de cimentos endodônticos para esses tecidos⁶⁵.

O reparo dos tecidos periapicais após o tratamento endodôntico depende além da composição química e das propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais obturadores, também da quantidade de componentes que podem ser degradados e penetrar na região periapical^{9,28,67}. Assim, após a obturação do canal radicular, o contato direto ou indireto do cimento endodôntico com o periápice⁷³, pode provocar uma reação inflamatória local ou acentuar uma inflamação já presente, comprometendo o processo de reparo^{9,44,73}.

Diante de estudos demonstrando agressão aos tecidos periapicais proveniente de cimentos endodônticos^{43-45,74,76}, onde células inflamatórias localmente presentes após a obturação dos canais radiculares podem sofrer os efeitos de substâncias liberadas durante a presa desses materiais^{9,28,67,73} e considerando ainda determinadas propriedades como a bioestimulação^{1,5,56} e a

modelação inflamatória tecidual^{13,71} próprios da laserterapia, optou-se por avaliar o efeito da irradiação com o laser de baixa intensidade sobre macrófagos expostos a determinados cimentos endodônticos.

Como o contato de um cimento endodôntico com o tecido conjuntivo periapical pode promover a estimulação e ativação dos macrófagos, e esta é uma das principais células responsáveis pela resposta inflamatória de origem endodôntica^{47,60,73}, optou-se pelo estudo das respostas deste tipo celular. A opção pelo uso de células de uma linhagem imortalizada (macrófago murino RAW264.7) foi devido à quantidade de células necessária para que, contidas em cada compartimento da placa de cultura de 24 poços pudessem ser submetidas uniformemente ao feixe de irradiação laser determinado pelo protótipo de laser idealizado para tal.

No presente estudo foi utilizado um protótipo laser infra-vermelho próximo de diodos InGaAsP (LASERTable; $\lambda 780 \pm 3 \text{ nm}$, 25 mW)^{5,56,57}, o qual foi projetado para fornecer uma irradiação uniforme aos poços nos quais as células foram plaqueadas. Esse dispositivo foi utilizado devido a homogeneidade da luz laser recebida pelos macrófagos em cultura, caracterizando um modelo experimental preciso.

As doses de irradiação utilizadas no estudo piloto ($1\text{J}/\text{cm}^2$, $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$) foram selecionadas de acordo com pesquisas realizadas tanto com macrófagos como com outros tipos celulares^{5,73}, e a partir dos resultados preliminares apresentados no presente estudo, para os demais testes propostos

selecionou-se a dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ pois esta apresentou elevados valores de viabilidade dos macrófagos.

Estudos anteriores vêm demonstrando efeitos benéficos do uso do LBI em diferentes níveis de pesquisa^{8,13,71} avaliando a resposta tecidual determinada por cimentos endodônticos à base de OZE. Por meio de análises histológicas de dentes de macaco, Crisci¹³, 2008, verificou melhor resposta tecidual ao cimento Endofill, com aceleração do processo de reparo periapical após a utilização do LBI, principalmente o infra-vermelho. A irradiação do tecido subcutâneo de camundongos que recebeu espécimes contendo este cimento, também levou à diminuição do efeito irritante causado por ele⁷¹, assim como do número de mastócitos presentes no tecido conjuntivo próximo ao material obturador⁸. Assim, o LBI mostrou ter efeito positivo sobre as respostas teciduais quando cimentos menos biocompatíveis, como os à base de OZE, são utilizados.

Sousa et al.⁷³, 2009, verificaram que o LBI, quando aplicado sobre cultura de macrófagos peritoneais ativados por LPS e expostos ao cimentos Sealapex e AH Plus, diminuiu a secreção de TNF- α , um importante mediador inflamatório, porém o efeito da irradiação na liberação de NO por parte dessas células não foi avaliado. Já, os efeitos teciduais decorrentes do uso do cimento à base de OZE levantam a necessidade de mais estudos a respeito da irradiação do LBI mediante ao seu uso também ao nível de cultura de células. Assim, a partir dos resultados obtidos em outros experimentos, torna-se oportuno o estudo do efeito do LBI sobre macrófagos expostos ao cimento Endofill, comparando-se com o Sealapex e o AH Plus.

Levando-se em conta que o processo inflamatório pode decorrer de um estímulo proveniente da obturação do canal radicular, deve-se considerar a capacidade dos cimentos endodônticos de estimular a ação dos macrófagos, cuja liberação de mediadores químicos torna-se ponto de partida para a avaliação da citotoxicidade desses materiais⁴⁷. Para se avaliar a produção desses mediadores, é importante considerar a concentração do material obturador que será colocado em contato com a cultura de células, sendo que nesta análise ocorrem as condições necessárias para estudar o metabolismo e comportamento celular em contato com diferentes materiais⁶².

Para tal, inicialmente foi determinada a concentração adequada para cada cimento, de modo que proporcionasse um número satisfatório de células viáveis para a realização dos testes propostos. Dependendo da concentração de um material citotóxico, grande parte das células em contato com ele caminhará para a necrose⁴⁷ e a ausência de um número representativo de células viáveis nos ofereceria índices nulos ou bastante baixos da liberação de mediadores celulares²⁶. Devido a esse fato, torna-se natural que, ao início do experimento, maiores concentrações dos cimentos estudados causem alto índice de morte celular, o que fatalmente ofereceria índices desprezíveis, ou até mesmo nulos da secreção de mediadores inflamatórios, requerendo assim a busca de um aceitável número de células viáveis mediante maiores diluições³¹. Portanto, para cada cimento avaliado, foi determinada a concentração que resultou em viabilidade celular próxima a 50%, satisfatória para os testes aplicados. Essa concentração foi determinada de acordo com a norma ISO 10993-5³³, a qual preconiza que

materiais devem ter seu efeito citotóxico determinado pelo cálculo do valor de IC_{50} , isto é, a concentração inibitória que reduz em 50% o número de células viáveis³³. Para tanto, foi utilizado o teste de citotoxicidade MTT, que, além de ser preconizado pela International Standard Organization – Norma ISO 10993-5³³, apresenta como vantagens a simplicidade, rapidez e precisão²².

De acordo com Karapinar et al.³⁶, 2011, cimentos endodônticos apresentam diferente citotoxicidade, dependendo de sua composição química. No entanto, a metodologia e o tipo celular utilizados podem ser fatores de interferência para essa avaliação.

No presente estudo, cada material endodôntico colocado em contato com a cultura de macrófagos, apresentou uma concentração diferente para a obtenção de 50% de células viáveis.

Quando os materiais obturadores foram comparados entre si, o Endofill mostrou-se menos biocompatível, pois, além da necessidade de menor concentração desse cimento (6 $\mu\text{g/ml}$) para resultar na mesma quantidade de células viáveis que os demais materiais, estimulou uma maior produção de NO, de forma significativa em relação ao Sealapex e AH Plus ($p < 0,001$). Esses dados são confluentes com a preocupação em torno do potencial irritante que cimentos a base de OZE apresentam, o qual já se tem demonstrado na literatura^{17,66,70,74,76}.

Por outro lado, o AH Plus e Sealapex foram menos diluídos para se alcançar a mesma viabilidade dos macrófagos (30 $\mu\text{g/ml}$ e 75 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente), e ao mesmo tempo, apresentaram baixo índice de produção de

NO, sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$), comprovando a melhor biocompatibilidade já demonstrada por parte desses materiais^{2,7,16,20-22,36,44,45,63,76}.

A maioria dos trabalhos que avaliaram a biocompatibilidade do Sealapex, tanto com a formulação antiga como com a atual que apresenta modificações em sua composição, mais propriamente na substituição do sulfato de bário pelo trióxido de bismuto, têm apresentado bons resultados, com reação inflamatória e efeito citotóxico baixos relacionado a esse material^{42,22,45,63,68,70,76}, de forma semelhante ao encontrado no presente estudo, onde o Sealapex foi o menos citotóxico. Por outro lado, alguns estudos avaliando esse cimento em sua nova formulação, mostraram resultados conflitantes. Por meio de análise histológica, uma pior resposta inflamatória tecidual foi correlacionada às alterações na sua composição original⁶⁹, enquanto um elevado índice de citotoxicidade oferecido pela nova formulação pode ser devido à elevada sensibilidade de células humanas utilizadas⁶⁷.

No presente estudo, a viabilidade de macrófagos expostos ao cimento AH Plus foi considerada intermediária em relação aos outros dois cimentos analisados. Já a literatura tem mostrado resultados controversos em relação a esse cimento, provavelmente devido aos diferentes tipos celulares em que são avaliados. Alguns achados demonstrando efeito citotóxico mínimo ou ausente por parte do cimento AH Plus, tiveram seus testes de viabilidade realizados com fibroblastos^{2,36}. Eldeniz et al.¹⁶, 2007, avaliando a resposta de duas linhagens desse tipo celular frente ao AH Plus, verificou sua citotoxicidade em dois períodos, encontrando efeito altamente citotóxico sobre a linhagem L929

imediatamente após a presa, que foi reduzido depois de 7 dias. Porém, não exerceu qualquer efeito citotóxico sobre fibroblastos de gengiva humana.

A biocompatibilidade de cimentos à base de OZE têm sido amplamente estudada, consolidando sua inferior resposta tecidual, principalmente quando comparado aos cimentos Sealapex e AH Plus. Tanomaru-Filho et al.⁷⁶, 1998, verificaram persistência do processo inflamatório na região apical e periapical após obturação com do cimento Fill Canal, à base de OZE. Da mesma forma, em estudos realizados por Scarparo et al.⁶⁶ (2009) e Silveira et al.⁷⁰ (2011), os cimentos à base de OZE apresentaram maior potencial para irritação do tecido subcutâneo de ratos e reação inflamatória severa, a qual não diminuiu ao longo do tempo. A citotoxicidade desse tipo de cimento também tem sido avaliada, sendo que macrófagos expostos ao Endofill⁶⁸ e fibroblastos em contato com Pulp Canal Sealer apresentaram baixa viabilidade celular⁷⁹, o que demonstra o alto efeito citotóxico desses cimentos. No presente estudo, o Endofill apresentou maior citotoxicidade que o Sealapex e AH Plus, o que pode ser explicado pela presença de eugenol em sua composição⁷¹.

Estudos em cultura de células têm avaliado efeitos citotóxicos de cimentos endodônticos^{2,16,22,36,42,51,52,62,63,67,68,73}. No entanto, testes de citotoxicidade celular não devem ser utilizados isoladamente para avaliar a biocompatibilidade desses materiais⁹. Por isso, além de determinar a citotoxicidade dos cimentos Endofill, AH Plus e Sealapex, por meio da análise da viabilidade celular, esse estudo avaliou também a produção de óxido nítrico como um parâmetro adicional para análise da biocompatibilidade dos referidos materiais. A mensuração da produção

de NO através do método de Griess, fornece dados adicionais para a análise da citotoxicidade de materiais, além de ser um procedimento já bem estabelecido e amplamente utilizado nos estudos relacionados à sua quantificação⁷⁸.

Na presença de diferentes estímulos, como o contato com cimentos endodônticos, os macrófagos sintetizam, dentre outras substâncias, compostos intermediários do nitrogênio, como o NO, proveniente da fagocitose desses materiais^{26,47}.

O NO é produzido de acordo com a citotoxicidade de um material que, quanto mais citotóxico, gera maior resposta celular para fagocitá-lo, repercutindo no aumento da sua liberação⁶². Assim, o NO é considerado um dos principais mediadores da inflamação tecidual⁵³, além de desempenhar papel fundamental na regulação da reação inflamatória periapical quando associado a outras citocinas²⁷. Quando produzido em grandes quantidades desempenha função citotóxica, tendo efeito na potencialização do processo inflamatório e no processo de reabsorção óssea periapical^{26,75}. Por outro lado, se liberado em índices baixos, pode favorecer o processo de isolamento do corpo estranho, induzindo reparo pós-obturaçã²⁶.

Portanto, após a obturação do canal radicular, de acordo com o tipo de material utilizado, o macrófago pode ser ativado e liberar mediadores químicos que apresentam papel importante no reparo biológico que se estima obter

A produção de NO no grupo onde os macrófagos receberam LPS (1µg/ml), foi significativamente maior em relação as células somente em contato com o meio de cultura ($p < 0,01$). Esse resultado é condizente com os encontrados na literatura, sendo o LPS bacteriano consagrado como forte estímulo aos

macrófagos^{77,58,62,68,73}. Isso torna possível a comparação entre os grupos, já que as células utilizadas apresentam as mesmas condições experimentais.

Quando a ação do LBI foi analisada em relação aos grupos experimentais, apesar dos resultados demonstrarem efeito significativamente favorável do laser no aumento da viabilidade dos macrófagos expostos aos cimentos endodônticos ($p < 0,001$), não houve diferença entre a produção de NO quando cada material foi comparado com o respectivo grupo irradiado ($p > 0,05$), fato que ficou evidente com o emprego do cimento AH Plus, que apresentou mais de 100% de aumento de viabilidade com a aplicação do laser sem, no entanto, oferecer qualquer alteração na liberação do NO. Isso demonstra que, ao se obter aumento do número de células, não houve proporcionalmente o esperado aumento de liberação do NO, levantando a hipótese do efeito benéfico do laser, não só em termos de viabilidade celular, mas também na liberação do NO por parte dos macrófagos.

Assim, a associação de novas tecnologias, como o uso do laser de baixa intensidade, pareceu contribuir para mudanças positivas em relação à viabilidade celular como também na liberação de mediadores como o NO, quando do contato direto de macrófagos com diferentes cimentos endodônticos, corroborando com outros achados que demonstraram melhoras nos quadros inflamatórios, mediante a aplicação da laserterapia^{8,13,71}. Por fim, devemos ressaltar que este efeito não foi evidenciado somente ante ao uso de um cimento de menor compatibilidade biológica como o OZE, mas também, vindo de encontro com os achados de Souza et al.⁷³, 2009, frente a cimentos vistos como mais biocompatíveis, como o Sealapex e o AH Plus.

CONCLUSÃO

As condições e metodologia em que esse estudo foi realizado nos permite concluir que:

- Todos os cimentos endodônticos, permitiram índices significativamente maiores de viabilidade celular quando da aplicação do LBI.
- O cimento AH Plus apresentou aumento significativamente maior de viabilidade dos macrófagos em relação aos demais cimentos quando da aplicação do LBI , seguido do Sealapex e Endofill,
- O LBI não interferiu de forma significativa na produção de NO por parte dos macrófagos expostos a nenhum dos cimentos endodônticos estudados.

REFERÊNCIAS*

- 1 AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012; 27: 237-49.
- 2 Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J.* 2010; 43: 148–53.
- 3 Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 179-84.
- 4 Araújo GS. Avaliação histológica do efeito do laser de baixa intensidade na resposta do tecido conjuntivo ao cimento Endofill [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.
- 5 Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CAS. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2012. Feb 8. [Epub ahead of print]
- 6 Berbert FLCV, Leonardo MR, Bonetti-Filho I, Berbert A. Capacidade seladora do cimento CRCS em função de diluições do eucaliptol e de proporção pó-líquido predeterminadas. *Rev Bras Odontol.* 1997; 54: 129-32.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

<http://nlm.nih.gov/bvs/uniformrequirements.html>

- 7 Berbert FLCV, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 93: 184-9.
- 8 Berbert FLCV, Sivieri-Araújo G, Ramalho LTO, Pereira SAL, Rodrigues DBR, Sivieri de Araújo M. Quantification of fibrosis and mast cells in the tissue response of endodontic sealer irradiated by low-level laser therapy. Lasers Med Sci. 2010; 26: 741-7.
- 9 Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RLW, Bouillaguet S, et al. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009; 91: 839-44.
- 10 Burney S, Tamir S, Gal A, Tannenbaum SR. A Mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. Nitric Oxide. 1997; 1: 130–44.
- 11 Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblast. J Periodontal Implant Sci. 2010; 40: 105-10.
- 12 Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press; 2009. 352p.
- 13 Crisci FS. Efeito do laser de baixa intensidade na polpa e nos tecidos apicais e periapicais em dentes de macaco [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

- 14 Crisci FS. Reação histológica de exposições pulpares em dentes de ratos à aplicação do laser de baixa intensidade somente ou em associação ao capeamento com hidróxido de cálcio [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2002.
- 15 Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 885–91.
- 16 Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007; 40: 329–37.
- 17 Farhad AR, Hasheminia S, Razavi S, Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rat. *J Oral Sci.* 2011; 53: 15-21.
- 18 Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function *Eur Heart J.* 2011; 33: 829-37. [Epub 2011 Sep 1]
- 19 Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003; 70: 81-9.

- 20 Gomes-Filho JE, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, Costa MMTM, et al. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106: 71-6.
- 21 Gomes-Filho JE, Gomes AC, Watanabe S, Oliveira SHP, Bernabé PFE, Percinoto C. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. *J Appl Oral Sci.* 2010; 35:1577-9. [Epub 2009 Sep 23]
- 22 Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Simonetti C, Oliveira SHP. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod.* 2009; 35: 1577-9.
- 23 Gouw-Soares S, Tanji E, Haypek P, Cardoso W, Eduardo CP. The use of Er:YAG, Nd:YAG and GaAlAs lasers in periapical surgery: three years clinical case. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19: 193-8.
- 24 Green, LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum, SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131-8.
- 25 Grossman, LI. An improved root-canal cement. *J Am Dent Assoc* 1958; 56: 381-5.
- 26 Gutierrez JCR. 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.

- 27 Hama S, Takeichi O, Hayashi M, Komiyama K, Ito K. Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. *Int Endod J.* 2006; 39: 179-84.
- 28 Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J.* 2003; 36: 147-60.
- 29 Houghton AM, Hartzell WO, Robbins CS, Gomis-Rüth FX, Shapiro SD. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature.* 2009; 460: 637–41.
- 30 Houreld NN, Sekhejane PR, Abrahamse H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits pro-inflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers Surg Med.* 2010; 42: 494–502.
- 31 Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang, YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod.* 2005; 31: 679.
- 32 Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1992; 211: 177-82.
- 33 International Standards Organization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices – part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 1999.

- 34 International Standards Organization. ISO 7405: preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials. Geneva: ISO; 1999.
- 35 Janeway-Junior CA, Traves P. Imunologia: sistema imunológico na saúde e na doença. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- 36 Karapinar-Kazandag M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2011; 44: 626–34.
- 37 Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Thiol reactive agents eliminate stimulation of cell attachment to extracellular matrices induced by irradiation at $\lambda=4820$ nm: Possible involvement of cellular redox status into low power laser effects. *Laser Ther.* 2001; 11: 177-87.
- 38 Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 307–14.
- 39 Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 355-61.
- 40 Karu TI. Low-power laser therapy. *Biomedic Photonic.* 2003; 48: 1-26.
- 41 Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg.* 1995; 221: 220-35.

- 42 Lee DH, Lim BS, Lee YK, Kim NR, Yang HC. Inhibitory effects of root canal sealers on the expression of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007; 83: 91-6.
- 43 Leonardo MR, Flores DSH, Silva FWGP, Leonardo RT, Silva LAB. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH Plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod.* 2008; 34: 822– 5.
- 44 Leonardo MR, Silva LAB, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15: 28-32.
- 45 Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Assed A, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers--Histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod.* 1997; 23: 428-32.
- 46 Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. 1491p.
- 47 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.
- 48 Lopes HP, Siqueira-Junior JF. *Endodontia: biologia e técnica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. 980p.

- 49 Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*. 1988; 27: 8706-11.
- 50 Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2004; 34: 260-5.
- 51 Maseki T, Yasumura K, Nanba I, Kobayashi F, Nakamura H. Alterations in macrophages after exposure to root canal filling materials. *J Endod*. 1996; 22: 450-4.
- 52 Mendes STO, Sobrinho APR, Carvalho AT, Côrtes MIS, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod*. 2003; 29: 95-9.
- 53 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43: 109-42.
- 54 Moriyama Y, Moriyama EH, Blackmore K, Akens MK, Lilge L . In vivo study of the inflammatory modulating effects of low-level laser therapy on iNOS expression using bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol*. 2005, 81: 1351-5 .
- 55 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.

- 56 Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett*. 2011; 8: 155–63.
- 57 Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Increased viability of odontoblast like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Phys*. 2010; 20: 1659–66.
- 58 Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, Leonardo RT. Endodontic chelators induce nitric oxide expression by Murine-cultured macrophages. *J Endod*. 2009; 35: 1–5.
- 59 Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J*. 2007; 202: 131-8.
- 60 Perassi FT, Bonetti-Filho I, Berbert FLCV, Carlos IZ, Leonardo RT. Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, Sealapex and Endomethasone. *J Endod*. 2004; 30: 534-7.
- 61 Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a recent novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov Med*. 2011;11(57):154-9.
- 62 Queiroz CES, Soares JA, Leonardo RT, Carlos IZ, Dinelli W. Evaluation of cytotoxicity of two endodontic cements in a macrophage culture. *J Appl Oral Sci*. 2005; 13: 237-42.

- 63 Queiroz CES, Soares JA, Leonardo RT, Queiroz JAM. Indução da produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos pelos cimentos endodônticos Sealapex e Topseal. *Sitentibus*. 2006; 34: 145-56.
- 64 Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. São Paulo: Manole; 1999. 192p.
- 65 Sari S, Duruturk L. Radiographic evaluation of periapical healing of permanent teeth with periapical lesions after extrusion of AH Plus sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104: 54–9.
- 66 Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EVF. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide–eugenol endodontic sealers. *J Endod*. 2009; 35: 229-32.
- 67 Scelza MZ, Linhares AB, Da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J*. 2012; 45: 12–8.
- 68 Silva PT, Leonardo RT, Carlos IZ, Bonetti Filho I. Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos em relação aos reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. *Rev Odontol UNESP*. 2005; 34: 17-23.
- 69 Silva-Herzog D, Ramírez T, Mora J, Pozos AJ, Silva LAB, Silva EAB, et al. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J*. 2011; 44: 440–6.

- 70 Silveira CMM, Pinto SCS, Zedebski RAM, Santos FA, Pillatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J.* 2011; 22: 21-7.
- 71 Sivieri-Araújo G, Berbert FLCV, Ramalho LTO, Rastelli ANS, Crisci FS, Bonetti-Filho I, et al. Effect of red and infrared low level laser therapy in endodontic sealer on subcutaneous tissue. *Laser Physics.* 2011; 21: 2149-55.
- 72 Sosroseno W, Barid I, Herminajeng E, Susilowati H. Nitric oxide production by a murine macrophage cell line (RAW264.7) stimulated with lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17: 72-8.
- 73 Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF- α and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27: 37-42.
- 74 Suzuki P, Souza V, Holland R, Gomes-Filho JE, Murata SS, Dezan-Junior E, et al. Tissue reaction to Endométhasone sealer in root canal fillings short of or beyond the apical foramen. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19: 511-6.
- 75 Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogiso B, et al. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-gamma-producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J.* 1999; 32: 124-30.
76. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 85-9.

- 77 Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol.* 1992 ; 10: 411-52.
- 78 Vitral JCA, Silva AA, Souza MA, Ferreira AP, Vitral RWF. Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* 2008; 8: 359-65.
- 79 Willershausen I, Callaway A, Benjamin B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med.* 2011; 7:15.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 29 de março de 2012.

Ariete Patrícia Rabello