

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência das figuras 1 a 5, não incluídas pelo autor no arquivo original.

Paulo Tadeu da Silva

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS QUANTO A LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para a obtenção do título de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Endodontia).

Orientadora: *Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos*

ARARAQUARA
-2002-

Silva, Paulo Tadeu da

Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos / Paulo Tadeu da Silva – Araraquara : [s.n.], 2002.

132 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

1. Macrófagos 2. Materiais restauradores do canal radicular
3. Peróxido de hidrogênio 4. Óxido nítrico I. Título.

Paulo Tadeu da Silva

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS
ENDODÔNTICOS QUANTO A LIBERAÇÃO DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURAS DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

2º Examinador: Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo

3º Examinador: Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama

Araraquara, 05 de fevereiro de 2002

Dados Curriculares

Paulo Tadeu da Silva

NASCIMENTO 20.5.1953 – ITIRAPINA/SP

FILIAÇÃO Waldyr Lage Silva
Wanda Aparecida Vieira da Silva

1972/1976 Curso de Graduação
Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara-SP

1975 Monitor da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara-SP

1976/1977 Curso de Especialização em Endodontia na Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara-SP

1996/2001 Professor do Curso de Especialização em Endodontia da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas-Regional de São Carlos-SP

2000/2002 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedicatória

À **Deus**, Senhor e fonte de amor e sabedoria eterna por ter permitido que eu conquistasse mais uma etapa em minha vida.

Ao meu pai **Waldyr Lage Silva** (In Memoriam), por ter sido o alicerce e o esteio da minha formação, hoje aqui não presente, neste plano físico, mas alocado em algum lugar do "Espírito Superior" que olha e guia por todos os aqui presentes.

À minha mãe **Wanda**, pela sabedoria de vida, amor, dedicação e incentivo para a minha realização, dedico este trabalho.

Ao meu irmão **Carlos**, pelos estímulos, palavras, atitudes perseverantes que conduziram a minha caminhada.

À **Cristina**, pelo apoio e ajuda.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora **Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**, que com sua sabedoria, paciência, perspicácia, soube transmitir seus ensinamentos seguros e objetivos, para que durante a minha caminhada, pudesse chegar a recompensa final, da realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**: Através de sua amizade, gestos, sabedoria, empenho, paciência e uma dedicação de maneira ímpar, formou um discípulo e admirador. Será um dos "luminares" da Endodontia Técnica e Biológica, em um futuro não muito longínquo.

Ao **Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo**, "Ícone da Endodontia Biológica", com o seu expressionismo, no seu modo de agir, pensar como pessoa humana, sensível, pesquisador e orientador, responsável pela minha formação na Endodontia, e também de muitos discípulos seguidores do mesmo. É um exemplo de dignidade e personalidade como ser humano.

Ao Amigo e Colega **Dr. Marcos Jacobovitz**, pelo apoio e incentivos constantes à minha pessoa, para a minha realização deste Curso de Mestrado em Odontologia (Área de Endodontia).

Meus Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached**, Diretor e **Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard**, Vice-Diretor da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Ao **Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, em níveis de Mestrado e Doutorado da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Aos **Profs. Drs. Roberto Miranda Esberard, Idomeo Bonetti Filho, Mário Tanomaru Filho e Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, meus respeitos e agradecimentos aos ensinamentos e atenção que me devotaram.

Ao **Prof. Dr. Jayme Maurício Leal**, pelo conhecimento, convivência e amizade.

Ao **Prof. Dr. Welington Dinelli**, pelo apoio e estímulo na realização do Curso de Mestrado.

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

À **Maria Helena Matsumoto Komasti Leves** e **Maria José Peron**, pela revisão bibliográfica.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia, **Dona Ivone, Dona Emília, Sr. Edison** e **Sr. Pedro**.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, **Mara, Vera, Rosangela** e **Janete**, pela ajuda, atenção e amizade.

À **Lívia**, pelo apoio constante nos incomensuráveis conhecimentos na área de computação.

À **Célia Regina Fachine Sanches Silva**, pela atenção, ajuda, paciência e amizade com que conduziu a digitação desta Dissertação.

À **Lenyra Camillo Zamai**, funcionária do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, pela atenção, amizade e ajuda.

A todos **Funcionários da Biblioteca**, pela educação, amizade, boa vontade, respeito e atendimento na ajuda ao desenvolvimento deste trabalho.

À funcionária do Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, **Marisa**, pela amizade e auxílio na execução deste trabalho.

Aos **Amigos do Curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Ao **Luís Rocatelli**, pela amizade e paciência com que ajudou e orientou a parte fotográfica deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Romeu Magnani**, pela grande contribuição quanto ao planejamento estatístico.

Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, especialmente da área de Endodontia, **Ângelo Poliselí Neto, Fernando Simões Crisci, Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, Maria Eugênia Flores Alatorre e Érica Sequeira.**

Ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro.

SILVA, P.T. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos.* Araraquara, 2002. 132p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Avaliou-se a citotoxicidade dos cimentos Topseal, EndoRez, Tubli-Seal e Kerr Pulp Canal Sealer E.W.T. quanto a liberação de derivados do oxigênio no contato cimento/cultura de macrófagos peritoneais de camundongos. Respectivamente os cimentos que mais liberaram H₂O₂ na concentração de 9 mg/ml foi o Topseal > Zimosan > EndoRez > Tubli-Seal = Kerr Pulp E.W.T. e na concentração de 18 mg/ml foi o Topseal > Zimosan = EndoRez > Tubli-Seal > Kerr Pulp E.W.T. Os que mais liberaram NO na concentração de 9 mg/ml foi o LPS > Topseal > Kerr Pulp E.W.T. > Tubli-Seal = EndoRez e na concentração de 18 mg/ml foi o LPS > Topseal = Kerr Pulp E.W.T. > Tubli-Seal > EndoRez.

Palavras-chave: Macrófagos; materiais restauradores de canal radicular; peróxido de hidrogênio; óxido nítrico.

SILVA, P.T. *Evaluation of citotoxicity of root canal sealers due to release of hydrogen peroxide and nitric oxide in peritoneal rat macrophage culture.* Araraquara, 2002. 132p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

It was evaluated the citotoxicity of the sealers Topseal, EndoRez, Tubli-Seal and Kerr Pulp Canal Sealer after exposure to rat peritoneal macrophage culture, due to oxygen derivate liberation. Respectively, the sealer that, liberated more H₂O₂ at 9 mg/ml concentration were Topseal > Zimosan > EndoRez > Tubli-Seal = Kerr Pulp E.W.T. and in concentration of 18 mg/ml were Topseal > Zimosan = EndoRez > Tubli-Seal > Kerr Pulp E.W.T. The greatest liberation of in NO concentration of 9 mg/ml were LPS > Topseal > Kerr Pulp E.W.T. > Tubli-Seal = EndoRez and in concentration of 18 mg/ml were LPS > Topseal = Kerr Pulp E.W.T. > Tubli-Seal > EndoRez.

Keywords: Macrophages; root canal fillings materials; hydrogen peroxide; nitric oxide.

Sumário

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DA LITERATURA	14
PROPOSIÇÃO	75
MATERIAL E MÉTODO	76
RESULTADO	89
DISCUSSÃO	92
CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
Anexos	128
Resumo	131
<i>Abstract</i>	132

Introdução

O tratamento do sistema de canais radiculares, desde o estabelecimento do correto diagnóstico até à preservação do caso constitui-se de atos operatórios interligados entre si, não podendo negligenciar-se qualquer dessas etapas, sendo a etapa operatória da obturação a que representa um reflexo dos predicados técnicos do profissional e, conseqüentemente, a comprovação do sucesso obtido em todas as etapas anteriores (Leonardo & Leal, 1998).⁴²

De acordo com Bonetti Filho,¹¹ em 1986, a obturação e o material obturador recebem uma ênfase especial porque substituirão a polpa radicular, e refletirão a postura do profissional em relação ao tratamento de canais radiculares.

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

Os cones de guta-percha representativos da parte sólida, e os cimentos obturadores (parte plástica), tem como função, preencher todos os espaços vazios modelados anteriormente pela instrumentação, promovendo uma obturação tridimensional a mais hermética possível e combatendo os microrganismos que escaparam da ação do preparo biomecânico e do curativo de demora. (Beltes et al., 1995;⁸ Leonardo, 1997).⁴⁹

Levando em consideração os mais variados aspectos de anatomia morfológica encontrada no terço apical dos dentes, esses materiais entram em contato direto com tecidos apicais e periapicais por um longo período, sendo que nesse momento, é de forma imperiosa a biocompatibilidade dos materiais obturadores (Bilginer et al., 1997;¹⁰ Leonardo, 1997;⁴⁹ Kolokouris et al., 1998).³⁷ Assim, o selamento do forame apical pela deposição de tecido mineralizado ou fibroso no ápice, representa o isolamento desse material obturador (corpo estranho), do restante do organismo.

A partir dessa premissa, surgiram os cimentos obturadores à base de óxido de zinco e eugenol, resina epóxi, hidróxido de cálcio, tendo como exemplo de marcas comerciais, Kerr Pulp Canal Sealer, Topseal, Sealapex, AH Plus e etc.^{2,15,25,27,48,58,62}

A citotoxicidade desses cimentos obturadores, juntamente ou isoladamente de seus componentes, tem sido estudada "in vitro" (Gerosa et al., 1995;²⁷ Vajrabhaya et al., 1997)¹⁰¹ e "in vivo" (Pertot et

al., 1992;⁶⁶ Torabinejad et al., 1995;⁹⁶ Pertot et al., 1997;⁶⁷ Rasquin, 1997).⁷⁴ Levando-se em consideração que a legislação atual dificulta através das normas da Ética, o emprego de pesquisas "in vivo" (Garcés-Ortiz & Ledesma-Montes, 1997)²⁶ e também as dificuldades inerentes a mesma, com grande número de variáveis, temos como opção a realização das pesquisas "in vitro".^{1,5,19,21,38,52,70,79,88,92,95,103}

No estudo de células em meio de cultura ocorrem as condições necessárias para avaliar o metabolismo e comportamento celular, em contato com diferentes materiais (Junqueira & Carneiro, 1997).³⁴ A análise de células é opção para a reprodução das reações celulares ocorridas frente aos materiais obturadores, e tem como vantagem o controle sobre os fatores experimentais e número de variáveis, sendo sugerido que se deva conhecer o comportamento de um grupo de células, antes de se utilizá-lo como modelo de estudo (Arenholt-Bindslev & Bleeg, 1990;⁴ Egea & Rubio-Manzanares, 1998).²⁰

Nas culturas de células, os cimentos obturadores ou os componentes que o constituem provocam alterações morfofuncionais possíveis de serem observadas e analisadas sob microscopia eletrônica ou óptica, com ou sem marcação celular com radioisótopos. As alterações da morfologia celular, evidenciam fenômenos intra e extracelulares de citotoxicidade partindo da instalação de processos degenerativos frente à exposição celular com material presente nos meios de cultura. As alterações morfofuncionais são indicativas de estimulação da capacidade

funcional de síntese protéica, enzimática, presença de mediadores químicos de vital importância no processo reparatório reacional, fatores de crescimento celular, produtos do ácido araquidônico, citocinas e outras substâncias que desencadeiam situações ou alterações degenerativas como o peróxido de hidrogênio (Pick & Mizel, 1981;⁶⁹ Leonardo, 1997)⁴⁹ e o óxido nítrico (Palmer et al., 1987;⁶⁴ Moncada et al., 1991;⁵⁹ Ialenti et al., 1992;³³ Teixeira et al., 1993;⁹⁴ Vespa et al., 1994;¹⁰² Norris et al., 1995).⁶¹

No processo inflamatório, tamanho da lesão, tipo, capacidade dos cimentos de estimular a ação dos macrófagos e a liberação de mediadores químicos responsáveis nessas respostas, são alguns dos fatores a serem levados em consideração (Leonardo, 1997).⁴⁹

A agressão, oriunda do contato com os materiais obturadores ocasionam nas células, alterações morfofuncionais e até morte celular, sendo que a liberação de mediadores químicos nos ajuda a avaliar a citotoxicidade destes materiais (Leonardo, 1997),⁴⁹ uma vez que quanto maior a liberação desses mediadores, maior é a agressão.

Dessa maneira a mensuração da produção de reagentes intermediários de NO e H₂O₂ em cultura de macrófagos, através de diferentes metodologias, pode ser utilizada na avaliação da citotoxicidade de materiais obturadores (Pick & Keisari, 1980;⁶⁸ Pick & Mizel, 1981;⁶⁹ Moncada et al., 1991;⁵⁹ Leonardo, 1997).⁴⁹

Revisão da literatura

Este capítulo revisa a literatura de forma sintética concernente à macrófagos, derivados do oxigênio e nitrogênio, hidróxido de cálcio e os cimentos obturadores de canal radicular derivados do hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol, Kerr Pulp Canal Sealer EWT (Extended Working Time), Topseal, Tubli-Seal™ e EndoREZ™.

Macrófagos

São células originadas de monócitos sangüíneos que migram para vários órgãos e tecidos onde se transformam em macrófagos. Os macrófagos fazem parte, juntamente com mastócitos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos da resposta inflamatória, resposta essa de defesa do organismo que ocorre no tecido conjuntivo visando destruir, diluir e isolar o agente agressor através da fagocitose. A fagocitose é uma das importantes atividades dos macrófagos que tem a capacidade de sintetizar e secretar enzimas e fatores reguladores da atividade de outras células como as citocinas e fatores de crescimento. A liberação de linfocinas pelos linfócitos T promove a ativação de macrófagos para sensibilizá-los contra antígenos de organismos infectados (Cotran et al., 1996).¹⁸ Quando um cimento obturador de canais radiculares, entra em contacto com o tecido conjuntivo periapical, promoverá à estimulação e ativação dos macrófagos, para a realização da

fagocitose (Leonardo, 1997).⁴⁹

Também macrófagos e linfócitos desempenham papel essencial no mecanismo mediado por células envolvidas na inflamação crônica (Trowbridge & Emiling, 1996).⁹⁸

Sua função é remover antígenos particulados, processar, apresentar o antígeno às células T (linfócitos T), desencadeando a resposta imune (Roitt et al., 1999).⁷⁶

A ativação dos macrófagos e linfócitos produz uma série de alterações morfofuncionais, como exemplo capacidade fagocítica, bactericida e citotóxicas aumentadas. Macrófagos peritoneais de ratas, como modelo celular "in vitro" são de fácil obtenção para testar respostas celulares frente a pastas e cimentos endodônticos, auxiliando a investigação da biocompatibilidade destes materiais especialmente sobre seus efeitos na resposta inflamatória e imune (Egea & Rubio-Manzanares, 1998).²⁰

Metzger,⁵⁴ em 2000, numa revisão sobre a presença dos macrófagos nas lesões periapicais, considerou-os a principal fonte das citocinas interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-1 alfa (IL-1 α) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais contribuem para a iniciação e regulação do processo inflamatório, ativando células ou para ação destrutiva como os osteoclastos relacionados à reabsorção óssea ou regulando o processo de reparo pela ativação dos fibroblastos elevando assim a síntese de colágeno produzido por estas células.

Derivados do oxigênio e nitrogênio

Pick & Keisari,⁶⁸ em 1980, preconizaram um método fotolorimétrico para análise da liberação do peróxido de hidrogênio obtido em cultura de macrófagos peritoneais de Porcos da Índia. O estudo baseou-se na oxidação do vermelho fenol mediado pela peroxidase de raiz forte (HRPO). Os macrófagos frente a estímulos de membrana, como por exemplo, partículas a serem ingeridas, liberam entre outros produtos H_2O_2 . Neste trabalho, os autores utilizaram agentes estimuladores como Acetato de forbol mirístico (PMA), Zimosan, Concanavalina A (Con A), Aglutinina de germe de trigo (WGA), N-formil-metionil-leucifenilalanina (FMLP) e A 23187. O método mostrou-se eficiente e viável devido as características não tóxicas ou neutras do vermelho fenol e da HRPO.

Em 1981, Pick & Mizel,⁶⁹ desenvolveram dois ensaios para análise quantitativa da produção de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em culturas de macrófagos peritoneais de fêmeas de rato C57BL/6N e de Porcos da Índia. A avaliação da produção de O_2^- está baseada na redução do ferricitocromo. A quantidade liberada de H_2O_2 é baseada na oxidação dependente de peroxidase de raiz forte (HRPO) do vermelho de fenol. Em culturas de macrófagos em placas de 96 orifícios, fundo chato para cultivo celular, foram adicionados 100 μ l de ferricitocromo ou vermelho fenol com HRPO. Após a adição de um agente desencadeador e estimulante da "explosão oxidativa" com incubação a

37°C por vários intervalos de tempo, as mudanças na absorvância do ferricitocromo e do vermelho fenol foram respectivamente medidas diretamente nas placas de cultura, utilizando-se um fotômetro automático. As principais vantagens deste método são as pequenas quantidades de células e reagentes utilizados, a sensibilidade e reprodutibilidade, o grande número de materiais que podem ser testados e especialmente a velocidade e conveniência oferecida pelo leitor automático.

A liberação de óxido nítrico (NO) ocorrida pela atividade biológica, e a ação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), foi estudada por Palmer et al.,⁶⁴ em 1987. Este estudo foi realizado em culturas de células, constituída da porção endotelial de células aórticas de coelhos ou células 3T3 e o NO foi determinado através do método de Quimioluminescência proveniente de sua reação com o ozônio. O relaxamento produzido pelo EDRF é indistinguível do produzido pelo NO. Os resultados sugeriram que o EDRF e o NO são semelhantes.

Uma revisão sobre o óxido nítrico (NO) abordando seus aspectos fisiológicos, patofisiológicos e farmacológicos foi realizada por Moncada et al.,⁵⁹ em 1991. A liberação fisiológica de NO depende da estimulação de uma enzima cálcio dependente a L-arginina. A enzima responsável pela catalização da conversão da L-arginina e oxigênio

molecular a L-citrulina, e do NO é a NO sintase (NOS). Sua liberação pode ser inibida pela L-canavanina, L-NMMA (NS-monometil-L-arginina), L-NIO (N-iminoetil-L-ornitina), L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metil-éster). O NO tem ações farmacológicas como relaxante vascular, inibidor da agregação plaquetária e citoprotetor. Pode ser liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano. A ativação macrofágica frente a L-arginina produz a síntese de L-citrulina e NO₂⁻ e a presença de L-NMMA previne a síntese destes produtos que tem expressão citotóxica. O LPS, assim como o IFN- γ são ativadores macrofágicos. A produção de NO, que é um gás solúvel de radical livre, ocorre também nos neutrófilos, células endoteliais e neurônios centrais específicos. L-NAME um potente inibidor da síntese endotelial de NO, não tem ação neutrofilica, e a estimulação para a síntese ocorre frente ao leucotrieno B4 e FMLP.

Em 1993, Teixeira et al.,⁹⁴ estudaram o papel das prostaglandinas e do óxido nítrico (NO) na reação inflamatória aguda em tecido intradérmico de Porcos da Índia. A administração de um inibidor da síntese de NO, N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) dependendo da dose, inibiu a formação de edema, que foi induzido em resposta a injeção intradérmica de bradicinina. A inibição através da L-NAME da indução da formação de edema pela bradicinina, é o efeito oposto, a injeção de nitroprussida de sódio (SNP) ou prostaglandina E1 (PGE1). Os resultados mostraram que a inibição da produção de NO reduz o acúmulo

de leucócitos e a formação de edema, podendo ser induzida através de diferentes mediadores da inflamação. A administração de L-NAME também causou a diminuição local do aporte sanguíneo. Os autores sugeriram que é este o mecanismo que exerce efeito antiinflamatório neste modelo.

Este estudo foi realizado por Vespa et al.,¹⁰² em 1994, para determinar o papel de reagentes intermediários do nitrogênio nas infecções por *Trypanosoma cruzi*. In vitro, reações antígeno-anticorpo obtidos durante a fase aguda de infecção, produziu elevada quantidade de óxido nítrico (NO) que foi correlacionada com a resistência ou suscetibilidade dos animais. In vivo, os níveis de NO₂⁻ mais NO₃⁻ no plasma durante a infecção foi maior nos ratos C57BL/6 do que nos ratos BALBL/c. Os resultados mostraram que no tratamento de C57BL/6 quando a síntese de óxido nítrico (NO) foi inibida, através de inibidores de NO síntase, houve aumento da parasitemia e mortalidade. Finalmente concluiu-se que o S-nitroso-acetyl-penicillamine é capaz de matar o *Trypanosoma* "in vitro" na presença de outras células, sugerindo que o mediador NO mata *T. cruzi*.

Um estudo para determinar se a produção de óxido nítrico (NO) pela ativação de culturas de macrófagos em níveis fisiológicos de arginina, ou através do aumento na disponibilidade de arginina como

substrato para síntese de NO foi realizado por Norris et al.,⁶¹ em 1995. A geração de NO pelos macrófagos é largamente responsável pela morte do *Trypanosoma cruzi*. O aumento exógeno de arginina ou citrulina resultou em significativo aumento da produção de NO e da sua completa liberação nos parasitas através da atividade macrofágica. A citrulina foi substituída totalmente pela arginina no suporte da produção de NO e na atividade de destruição do *Trypanosoma*. Estes resultados demonstraram que na expressão e ativação do ciclo da citrulina, NO são liberados pelos macrófagos. Os níveis de arginina no plasma são limitados em respeito a produção de NO no sangue e da atividade de destruição do *Trypanosoma* nestas células. Segundo os autores, o aumento dos níveis de substrato no plasma, em vez de arginina no sangue e biosíntese de NO, pode representar um meio de aumentar a atividade antimicrobiana "in vivo".

Os reagentes intermediários do oxigênio (peróxido de hidrogênio) e os reagentes intermediários do nitrogênio (óxido nítrico) (provenientes da atividade fagocitária) são indicativos de citotoxicidade (Leonardo, 1997).⁴⁹

Rasquin,⁷⁵ em 2000, avaliou a citotoxicidade dos cimentos endodônticos, Sealapex, Sealer 26, Topseal, Pro Canal e Endomethasone. Sob um leitor de ELISA foram avaliadas as liberações de

Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio, em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos em contato com soluções de cimentos, nas concentrações de 9 mg/ml e 18 mg/ml. Para o autor, os resultados permitiram observar maiores liberações de NO com os cimentos Topseal, Sealer 26 e Endomethasone, em qualquer uma das concentrações. Entre os cimentos Sealapex e Pro Canal, com as menores liberações de NO, parece não haver qualquer diferença significativa dentro das concentrações. Entretanto, na concentração de 9 mg/ml todos os cimentos apresentaram liberações bem menores do que na concentração de 18 mg/ml.

Nesses trabalhos, estudos prévios mostraram que a substância P (SP) causa vasodilatação na polpa dental. O objetivo deste estudo foi avaliar se o SP trabalha através do caminho do Óxido Nítrico (NO) por influência do escoamento sangüíneo pulpar, e para permitir o conhecimento do mecanismo intracelular do SP na fisiologia pulповascular. Uma mistura de polpas dentais frescas extraídas de dentes de 5 bovinos foram usadas. Após a maceração pulpar, SP, L-Name e nitropussiato de sódio (SNP), foram adicionadas ao tecido pulpar. Após incubação por um período de 1, 2, 3 ou 4 horas à 37°C e 100% de umidade amostras teciduais foram centrifugadas e o nitrato foi quantificado através de método da Quimioluminescência. Os dados foram analisados por múltiplas comparações estatísticas, empregando-se o

teste de ANOVA. Nas concentrações de 0,25, 50 e 100 mg/ml de SP, produziu claramente doses dependentes de Óxido Nítrico para cada nível de SO ($P < 0,05$). Adicionando-se, para cada concentração de SP, a síntese de NO foi efetivamente bloqueada pelo L-Name (95 a 99%). Nós concluímos entretanto que SP's promove a estimulação da produção de NO no endotélio de maneira independente, isto é a L-Name não tem efeito de inibição na produção de NO pelo SP. Estes resultados provam a evidência que o aparecimento de NO é envolvido na teoria do mecanismo de função da vasodilatação do SP (Kim et al., 2001).³⁶

Hidróxido de cálcio

O efeito do hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol e AH-26, sobre o afluxo de macrófagos e sobre o índice de fusão destas células na formação de granulomas, foi estudado por Catanzaro-Guimarães & Percinoto,¹⁶ em 1984. O hidróxido de cálcio, AH-26 e o óxido de zinco-eugenol, influenciaram o índice de afluxo de fagócitos mononucleares e o potencial de fusão destas células na formação de granulomas. O óxido de zinco e eugenol reduziu o índice de fusão e a proporção de células gigantes em um curto e longo período de implante. O longo período com o maior índice de afluxo de macrófagos mononucleares, sugeriu que este material foi altamente citotóxico para macrófagos. O hidróxido de cálcio não influenciou grandemente o

processo de fusão e o índice de entrada de fagócitos mononucleares. Isto indica que o hidróxido de cálcio desenvolveu um baixo efeito citotóxico nos macrófagos. AH-26 aumentou o afluxo de índice de fagócito monuclear durante períodos realizados por 4, 8, 12, 24, 30 e 40 dias. Nos períodos de 24-30 e 40 dias, a proporção de macrófagos mononucleares diminuiu, e entre 30-40 dias os valores permaneceram sobre os materiais mencionados. Índices de fusão e proporção de células gigantes também foram desprezados durante o longo período de implante, sugerindo que AH-26 pode ser considerado suave para moderado na reação de citotoxicidade ao sistema macrofágico. Os materiais implantados no tecido conjuntivo, atuam como um corpo estranho; assim como o material obturador de canal radicular quando extravasado para o ápice do dente, ficando em contato direto com os tecidos apicais e periapicais durante o tratamento endodôntico. Essa reação tipo corpo estranho é uma lesão inflamatória crônica caracterizada principalmente pela acumulação de fagócitos mononucleares, células linfóides e pela destruição de fibras do tecido conjuntivo e da substância intracelular. Dessa forma na inflamação crônica granulomatosa, a população de macrófagos provém de monócitos recrutados da circulação; células gigantes multinucleadas são formadas pela fusão de macrófagos, especificamente pela conjunção de um jovem, agora novamente chegando com células e um velho macrófago preferencialmente em mitose, e finalmente, células epiteliodes chegadas também de um macrófago por um processo especial de diferenciação,

principalmente quando existe um agente irritante no citoplasma do macrófago, promovendo uma divisão mitótica celular dos mesmos. Assim este estudo conclui que o afluxo de macrófagos mononucleares e a formação do índice destas células na superfície de lâminulas de vidro inseridos subcutâneamente em ratos pode ser um método viável para avaliação da biocompatibilidade de materiais dentários.

Em 1985, Schröder⁸⁰ relatou que a resposta tecidual ao hidróxido de cálcio colocado sobre o tecido pulpar humano inicia-se por uma necrose superficial considerada leve, estimulando a defesa, seguida da proliferação vascular e da migração de células inflamatórias, células mesenquimais e formação de colágeno. A seguir, ocorre diferenciação dos odontoblastos e forma-se o tecido mineralizado com aparência de dentina, observado com microscópio eletrônico de varredura, e histologicamente normalizando a função pulpar. A mineralização do colágeno inicia-se com calcificações distróficas tanto na zona de necrose, como pela degeneração das células dos tecidos adjacentes, levando a deposição de minerais no colágeno recentemente formado. A presença de íons de cálcio estimula a precipitação de carbonato de cálcio na área ferida contribuindo, possivelmente, para o processo de mineralização. A formação de tecido duro em contato com cimentos de hidróxido de cálcio indicou menor grau de agressão química inicial, quando comparada àquela produzida pelo hidróxido de cálcio puro. As diferentes respostas

dos tecidos aos vários cimentos de hidróxido de cálcio podem estar relacionados com fatores como: diferenças no pH e taxa de liberação de íons, cálcio e hidroxila. Outros componentes dos cimentos induzem diferentes reações químicas que podem inativar o hidróxido de cálcio ou serem nocivos aos tecidos.

A liberação de íons Ca^{++} e OH^- de materiais à base de hidróxido de cálcio pela extração com água foi investigada por Tagger et al.,⁹¹ em 1988, em tubos padronizados, de teflon bem delimitados com aproximadamente 7mm de diâmetro e 3mm de profundidade. Por meio do pH foi analisada a quantidade de OH^- , e a quantidade de Ca^{++} por um aparelho analisador de íons de cálcio. Os autores verificaram que o padrão de liberação de íons foi diferente e que as bases, Life e Dycal continuam a alcalinizar o meio, mesmo depois que a liberação de íons de cálcio não podia ser mais detectada. A liberação de íons de cálcio pelo CRCS foi muito pequena, e discreta a alcalinização do meio durante todo o teste. O eugenol livre no CRCS pode capturar o cálcio, tornando-o pouco encontrado na forma iônica. Além de alcalinizar o meio o Sealapex continuou liberando grande quantidade de cálcio durante todo o período de teste.

Uma revisão abordando os propósitos pelos quais o hidróxido de cálcio tem sido utilizado na Odontologia desde o início do

século XX, até os dias atuais, foi realizada por Foreman & Barnes,²⁵ em 1990. Assim, o hidróxido de cálcio foi discutido sob os aspectos de suas ações bioquímicas, dos produtos comerciais disponíveis e de suas formas de uso. Em suas ações bioquímicas, foi enfatizada a capacidade de induzir mineralização, de destruição de bactérias e de dissolução de material necrótico. Os materiais contendo hidróxido de cálcio foram classificados quanto à propriedade de sofrer, ou não, reação de presa, o que foi relacionado ao seu pH, tendo em vista o nível de íons cálcio e hidroxila livres, que permaneceram após o endurecimento. A atividade antibacteriana depende da disponibilidade de seus íons hidroxila. Dentre os vários empregos no tratamento de canais radiculares infectados e com lesão periapical, salientando suas propriedades bactericida, antiexsudativa, dissolvente de tecido necrótico e indutora de mineralização.

Em 1993, Leonardo et al.,⁴⁴ avaliaram "in vitro", usando um veículo viscoso, que é o polietileno glicol "400", a solubilidade, a dosagem de íons de Ca^{+2} e o pH do hidróxido de cálcio associado ao p-monoclorofenol canforado (PMCC) e ao p-monoclorofenol (PMC). A pasta Calen foi utilizada como fonte de hidróxido de cálcio. A solubilidade, foi averiguada através do uso de espectrofotômetro no ultravioleta modelo DU-70 da Beckman Instruments. A análise da liberação de cálcio, foi feita utilizando-se método titulométrico - complexometria com sal

etilenodiamintetraacetato de sódio (EDTA) e por espectotometria de absorção atômica. Para determinar o pH, utilizou-se o pHmetro da Metronal modelo E-120, acoplado a eletrodo combinado vidro - calomelano. Diante dos resultados os autores concluíram que: a) nas pastas à base de hidróxido de cálcio (Calen) associadas ao PMC, a adição de cânfora tornou-se desnecessária; b) a formação de p-monoclorofenolato de cálcio tornou mais prolongada a ação bactericida da pasta Calen + PMC; c) a solubilidade de p-monoclorofenol em associação com a pasta Calen, não sofreu influência da ausência da cânfora; d) o pH foi semelhante nas três pastas analisadas, independente da presença do p-monoclorofenol; e) a liberação de ions de Ca^{+2} foi mais lenta nas pastas associadas ao p-monoclorofenol.

O efeito do hidróxido de cálcio sobre o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi estudado bioquimicamente, através de um espectofotômetro, por Safavi & Nichols,⁷⁷ em 1993, que teve como fonte de LPS a *Salmonella typhimurium*. A microbiota predominante nos casos de necrose pulpar com lesão evidenciável radiograficamente é de bactérias Gram-negativas. Estas apresentam morfologicamente na sua parede celular os lipopolissacarídeos (LPS) responsáveis pela estimulação de síntese e liberação das principais citocinas ativadoras dos osteoclastos; desempenhando papel importante na reabsorção óssea periapical. Os LPS são liberados na lise e morte bacteriana. A eliminação dos microrganismos da cavidade pulpar tem sido

o objetivo maior nas terapias endodônticas, uma grande variedade de agentes antimicrobianos têm sido empregados com esta finalidade, destacando-se o emprego de hidróxido de cálcio, quer como substância irrigadora ou como medicação intracanal. O tratamento do LPS com hidróxido de cálcio, apresentou liberação de quantidades elevadas de ácidos graxos hidrólise. Os resultados sugerem, segundo os autores, que a degradação do LPS mediada pelo hidróxido de cálcio é uma importante reação e um efeito benéfico obtido pelo seu uso na clínica endodôntica.

A presença da fibronectinas durante a resposta precoce da polpa dentária de cães à dentina desmineralizada ou cimento contendo hidróxido de cálcio foi analisada microscopicamente e sob imunofluorescência por Tziafas et al.,⁹⁹ em 1995. A adsorção de fibronectina foi verificada na dentina e no cimento, só que em menor quantidade no cimento. Os implantes de dentina e cimento apresentaram coloração positiva à avaliação através da imunofluorescência. Os resultados sugeriram que a fibronectina desempenha papel importante na dentinogênese após indução de células da polpa por dentina desmineralizada, somando-se a isso o envolvimento da fibronectina na resposta pulpar não específica frente a implantação de cimento à base de hidróxido de cálcio.

Segura et al.,⁸² em 1997, estudaram o efeito do hidróxido

de cálcio na capacidade de adesão dos macrófagos ao substrato na resposta inflamatória. Após a estimulação os macrófagos eram recolhidos da cavidade abdominal de ratos Wistar e resuspenso em meio RPMI-1640. A análise da capacidade de aderência ao substrato foi feita em tubos de Eppendorf após 15 minutos de incubação a 37°C, umidade atmosférica e 5% de CO₂. Os resultados mostraram que o hidróxido de cálcio diminuiu a capacidade de aderência dos macrófagos ao substrato dependendo da dose e do tempo. Os autores concluíram que devido a influência do hidróxido de cálcio na adesão, último passo no processo de fagocitose, há uma redução da reação inflamatória dos tecidos periapicais, além disso, este efeito é capaz de explicar a fase final da capacidade do hidróxido de cálcio em induzir a mineralização.

Guigand et al.,²⁹ em 1999, avaliaram a citocompatibilidade de três cimentos endodônticos (à base de óxido de zinco e eugenol, à base de hidróxido de cálcio e à base de óxido de cálcio). Utilizaram uma linhagem de fibroblastos de camundongos (NIH3T3), usando um sistema que simulasse condições *in vivo*, onde o material dos cimentos permanecia no meio de cultura contendo os fibroblastos, separados por uma membrana de policarbonato. A biocompatibilidade foi avaliada 24, 72 e 168 horas após o contato, e os resultados envolveram o teste de citotoxicidade colorimétrico, a microscopia eletrônica de varredura e a citometria contínua. O presente

estudo demonstrou que cimentos à base de óxido de cálcio são tão biocompatíveis quanto a maioria dos cimentos à base de hidróxido de cálcio. Uma maior citotoxicidade foi encontrada para o cimento à base de óxido de zinco e eugenol. No entanto, estes testes *in vitro*, constituem somente o primeiro passo e não uma reprodução precisa das condições *in vivo*. Dessa forma necessita-se estender esses estudos para outros animais e então codificar novas investigações clínicas.

Leonardo et al.,⁵⁰ em 2000, avaliaram a citotoxicidade de quatro cimentos obturadores de canal radicular a base de hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26) e um cimento a base de óxido de zinco e eugenol (Fill Canal), microscopicamente nas suas mudanças morfológicas em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. O cimento mais citotóxico foi o Fill Canal, seguido em ordem decrescente de citotoxicidade pelo CRCS, Sealer 26, Apexit e Sealapex.

Em 2001, Han et al.³¹ avaliaram *in vitro* a efetividade do hidróxido de cálcio em dois diferentes veículos (aquoso e óleo de silicone) sobre *Enterococcus faecalis*. Após um período de incubação de 3 semanas, sessenta e oito dentes humanos foram divididos em 4 grupos:

- a) grupo sem smear layer e com pasta de hidróxido de cálcio + água;
- b) grupo sem smear layer e pasta de hidróxido de cálcio + óleo de

silicone (Vitapex); c) grupo com smear layer e pasta de hidróxido de cálcio + água; d) grupo com smear layer e pasta de hidróxido de cálcio + óleo de silicone. Os curativos foram colocados por 7 dias, e após a remoção dos curativos, fatias de dentinas foram coletadas e incubadas. Em seguida, quantidade de bactérias presentes foi avaliada. Diante dos resultados os autores concluíram que apenas no grupo da pasta de hidróxido de cálcio + óleo de silicone sem a remoção de smear layer a medicação não foi efetiva sobre as bactérias dos túbulos dentinários e que pastas aquosas de hidróxido de cálcio são recomendadas para uso como curativo.

Cimentos obturadores de canal radicular derivados do hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol, Kerr Pulp Canal Sealer EWT (Extended Working Time), Topseal, Tubli-Seal™ e EndoREZ™

Em 1964, Rappaport et al.,⁷³ utilizou dez materiais como cimentos obturadores de canais radiculares que foram avaliados experimentalmente. Estes materiais foram o óxido de zinco e eugenol, AH26, Diaket, Proco Sol radiopaco contendo prata, Proco Sol não contendo cimento de canal radicular, Kerr Sealer, Kloroperka, N₂, N₂ Medical e o Mynol, cimento obturador de canal radicular. Quatro métodos para testes foram utilizados: a) Estudo em animal modelo, onde dez cimentos endodônticos foram experimentados, no qual o tecido conjuntivo

subcutâneo de rato, foi observado para resposta inflamatória, aos implantes dos materiais experimentados sendo examinados histologicamente; b) Estudo da citotoxicidade em cultura de células na qual diluições variáveis do material experimentado, foi colocado em cultura de células HeLa, examinadas microscópicamente, e o grau de citotoxicidade foi observado; c) Em um estudo bacteriológico foram experimentados dez cimentos endodônticos onde o grau de inibição de crescimento para os materiais de testes para microrganismos conhecidos, foram mensurados, sendo que foram usados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*; d) Em um estudo em animal modelo, com materiais selecionados, quatro dos cimentos a serem experimentados foram colocados no saco conjuntival do olho do coelho. Nesta estrutura foi então observado o grau de inflamação, por um período de 1 minuto, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e de 24 a 48 horas, onde os critérios usados foram arbitrariamente classificados como: muito irritante, irritante, suavemente irritante e não irritante. Os resultados mostraram que o AH26 promoveu a menor resposta inflamatória e o N₂ produziu uma resposta inflamatória severa em todos os métodos acima descritos. Dessa maneira estudos definitivos de todos esses materiais experimentados, ainda precisam passar por outros testes de avaliações futuras.

Em 1980, Crane et al.,¹⁹ estudaram as propriedades biológicas e físicas de cimentos sem e com eugenol (Tubli Seal, Pulp

Canal Sealer. No-genol Root Canal Sealer). Os cimentos após manipulados, eram implantados abaixo do epitélio, em uma bolsa na cavidade bucal de hamster. Os animais foram sacrificados após 24 horas, 48 horas, 96 horas e 6 meses, e encaminhados para o processamento histológico, sendo que os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina. Diante dos resultados os autores concluíram, que o cimento sem eugenol foi mais compatível biologicamente aos tecidos, do que aqueles que continham eugenol na sua composição.

Através de implantes de tubos de teflon contendo os cimentos Kloropercha NΦ, Kerr Pulp Canal Sealer e AH-26, Olsson et al.,⁶² em 1981, estudaram em períodos de 14, 30, 90 e 180 dias, através de microscopia, a compatibilidade biológica desses cimentos. Foram observadas grandes presenças de macrófagos e de células gigantes do tipo corpo estranho, em volta do material, estas observações levaram os autores a considerar esses cimentos semelhantes com relação ao grau de irritabilidade. Esses resultados obtidos pelos autores foram baseados na mensuração de reação tecidual na qual os critérios histológicos adotados foram: 0 = sem reação, 1 = reação suave, 2 = reação moderada e 3 = reação severa.

Para estudar microscopicamente a reação tecidual aos cimentos AH-26 e o Hydron em períodos de 7, 14 e 30 dias, Safavi et al.,⁷⁸ em 1983, através de agulhas hipodérmicas, implantaram em tecido subcutâneo de 48 ratos, tubos de teflon contendo os cimentos. Os

resultados mostraram: a) inflamação e necrose nos testes dos materiais; b) a modificação da técnica de implantação pode ser reproduzida; c) esta técnica é adequada para teste dos materiais endodônticos; d) um apurado ranking de biocompatibilidade não pode ser obtido.

Morse et al.,⁶⁰ em 1984, avaliaram microscopicamente a citotoxicidade de 4 cimentos endodônticos, em tecido subcutâneo de ratos Wistar, em períodos de 6 e 48 horas. Os resultados mostraram que, a eucapercha foi o cimento que apresentou a menor resposta inflamatória, seguida da cloropercha e do óxido de zinco e eugenol. A xilopercha apresentou uma marcada irritação no período de 48 horas, não sendo recomendada pelos autores como um cimento endodôntico.

Biggs et al.⁹ em 1985, avaliaram a resposta dos macrófagos em cavidade peritoneal de 32 camundongos aos cimentos obturadores de canal radicular, Kerr, Roth 801, Grossman e Silatic 500-9. Os cimentos após manipulados eram colocados em um recipiente com a finalidade de se obter discos de 10,5 mm de diâmetro, em seguida eram imersos em água deionizada a 37°C por 5 dias. Após os implantes os animais foram avaliados microscopicamente em períodos de 1, 3, 5 e 7 semanas. De acordo com os resultados os autores concluíram que: a) os cimentos Kerr e Grossman causaram declínio no número de macrófagos quando implantados "in vivo", e aumento significativo do número de

eosinófilos; b) nenhum dos procedimentos resultou em resposta inflamatória aguda; c) uma parte dos macrófagos estavam associados a degradação dos cimentos Kerr e Grossman. Estes produtos foram fagocitados ou englobados; d) a cavidade peritoneal oferece um modelo efetivo para determinar a influência potencial dos materiais endodônticos sobre a ação dos macrófagos; e) a diluição na lavagem e a realização de coloração vital resulta em uma consistente diminuição na contagem de células gigantes vitais. Esta variação não reflete no percentual de células gigantes observadas durante a contagem diferencial de células usando um artifício de coloração.

Yesilsoy & Feigal,¹⁰⁶ em 1985, avaliaram visual e microscopicamente a citotoxicidade de sete materiais endodônticos, N2, Mynol, Rooth, Tubli Seal, Diaket, AH-26 e Life (agente capeador pulpar), sobre células L929 (fibroblasto murino) e culturas de fibroblastos de polpas dentais humanas, obtidas através da extração dos terceiros molares, não cariados, de pacientes com idade entre 19 e 24 anos. As células eram mantidas em meio mínimo de Eagle contendo glutamina-L, glucose (1000 mg/l), soro fetal bovino (10% do volume) e solução de estreptomicina - penicilina (10.000 U penicilina/ml e 10.000 mcg de estreptomicina/ml). Foram empregados 3 critérios para avaliação da atividade citotóxica: tamanho da zona de inibição, intensidade de coloração e grau de lise celular no interior da zona afetada. Devido a alta

toxicidade do formocresol, o mesmo foi utilizado como controle positivo e a solução salina como controle negativo. Os resultados observados mostraram que, o Formocresol, N2, Mynol e Rooth apresentaram alta citotoxicidade. Os cimentos Tubliseal e Diaket, mostraram citotoxicidade moderada, enquanto o Life, o AH-26 e a solução salina apresentaram reduzida citotoxicidade.

Tagger & Tagger,⁹⁰ em 1986, estudaram as propriedades biológicas dos cimentos AH-26 sem prata, Dentinol e o U of P (cimento à base de óxido de zinco e eugenol), através de implantes de 27 tubos de polietileno em tecido subcutâneo de Porcos da Índia. Decorridos 2 meses de injeção os animais foram sacrificados, os implantes removidos com os tecidos adjacentes, fixados em formalina, seccionados longitudinalmente com 6 μm de espessura e corados pela hematoxilina e eosina. A análise microscópica dos resultados mostrou que no grupo obturado com AH-26, 13 espécimes apresentavam reação inflamatória leve, 11 espécimes reação inflamatória moderada e 1 espécime reação inflamatória severa. No grupo do cimento U of P 3 espécimes apresentaram resposta inflamatória leve, 12 moderadas e 3 severas.

A citotoxicidade dos cimentos CRCS, Proco-Sol, Tubli Seal e Diaket A foi avaliada microscopicamente em períodos de 4, 8, 12, 24, 30 e 40 dias por Feiglin²³ em 1987. Os cimentos foram implantados em

tecido subcutâneo de ratas que pesavam entre 200 e 250 gramas. Após o preparo de acordo com as instruções dos fabricantes, os cimentos foram implantados em dorso de ratos. O CRCS mostrou ser o melhor cimento, seguido do Proco-Sol e do Tubli Seal, o Diaket A comportou-se como o mais citotóxico dos cimentos testados.

Em 1987, Kawakami et al.,³⁵ estudaram os aspectos ultraestruturais da calcificação inicial produzida por um cimento à base de hidróxido de cálcio (Vitapex). O cimento foi implantado em tecido subcutâneo do dorso e no abdômen de 39 ratos adultos, para avaliação microscópica em períodos de 4 a 129 dias. Nesses períodos observou-se a presença de calcificações. O cimento causou calcificação heterotrófica que foi dividida em 2 grupos: calcificação distrófica com matriz vesicular e calcificação semelhante ao tecido ósseo. Os resultados sugerem, ser esse um excelente material obturador de canais radiculares, capaz de induzir as células mesenquimais do ligamento periodontal e diferenciarem-se em osteoblastos ou cementoblastos.

Zmener & Cabrini,¹⁰⁷ em 1987, avaliaram o efeito de três materiais à base de hidróxido de cálcio em linfócitos e monócitos humanos. Os materiais CRCS, Sealapex e Dycal foram testados em discos, e em culturas de células estocados em ambiente seco, a 37°C por uma hora, sendo a seguir, expostos à suspensão celular, por 30 minutos.

A interpretação dos resultados foi realizada pela análise da adesão dessas células ao material testado, assim como pela variação na sua morfologia. Os autores observaram a seguinte seqüência em ordem crescente de efeitos adversos: Sealapex, CRCS e Dycal. Os autores consideraram o Dycal como o menos biocompatível devido à grande quantidade de ions de Ca^{++} e OH^- que ele liberava, elevando o pH, desnaturando as proteínas da parede celular e variando a sua morfologia. Os efeitos adversos do CRCS foram atribuídos ao fato desse material apresentar em sua composição eucaliptol e eugenol, sugerindo que algum traço de eugenol não reagido, pode permanecer tóxico após sua reação de endurecimento.

Um estudo microscópico do reparo de lesões periapicais em humanos, após tratamento endodôntico, onde foram utilizados três cimentos endodônticos diferentes, foi realizado por Eriksen et al.,²¹ em 1988. Foram utilizadas para o estudo 233 raízes com reação periapical crônica, visível radiograficamente. Para o preparo biomecânico dos canais radiculares, foram utilizados alargadores e limas Hedström, sendo o hipoclorito de sódio a 0,5% usado como solução irrigadora e a pasta de hidróxido de cálcio, como curativo intracanal, a qual permanecia no interior do canal radicular por um período de sete dias. Foram testados os cimentos Procosol (à base de óxido de zinco e eugenol), AH-26 (à base de resina epóxica) e Kloropercha ND (à base de guta-percha, resina e

clorofórmio). O reparo das lesões periapicais foi acompanhado pelo R-X padronizadas e de acordo com o sistema PAI, por um período de 3 anos, e os resultados demonstraram não haver diferenças estatisticamente significante entre os grupos experimentais.

Em 1988, Leal et al.,⁴¹ estudaram sob microscopia a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Sealapex, CRCS, Fill Canal e N-Rickert em tecido subcutâneo de rato por períodos de 7, 21 e 60 dias. Aos 7 dias o Sealapex e o N-Rickert provocaram uma reação tecidual classificada como moderada, já o CRCS e o Fill Canal provocaram reação inflamatória intensa. No período de 21 dias houve uma diminuição em todos os quadros inflamatórios, ficando o Sealapex e o N-Rickert com reação tecidual pequena, o CRCS com reação moderada. Aos 60 dias o Sealapex, N-Rickert e o CRCS exibiram uma pequena resposta inflamatória, e no Fill Canal a resposta era moderada.

Tronstad et al.,⁹⁷ em 1988, testaram a solubilidade e a biocompatibilidade do CRCS e do Sealapex em mandíbulas de cães. Foram utilizados quatro animais, nos quais após anestesia, era realizada uma incisão sulcar que media 2 mm de profundidade, 2 mm de diâmetro e que se distanciava, 10 mm uma da outra. Cilindros de teflon com as mesmas dimensões e 1,3 mm de diâmetro interno, foram preenchidos com o cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Roth 801), à base de hidróxido de cálcio (CRCS, Sealapex) ou com uma pasta contendo

solução salina e hidróxido de cálcio, e colocados imediatamente nas perfurações efetuadas no tecido ósseo de cada mandíbula. Decorridos 90 dias, os animais foram sacrificados, suas mandíbulas preparadas para análise histológica e avaliadas por microscopia óptica. Os cilindros que continham pasta com hidróxido de cálcio estavam completamente preenchidos por osso. As amostras contendo Sealapex estavam parcialmente absorvidas e havia o crescimento de tecido conjuntivo no interior dos receptáculos. Grandes quantidades do material eram vistas no interior de macrófagos e nos tecidos subjacentes aos cilindros de teflon. O cimento à base de óxido de zinco e eugenol e o CRCS, após 3 meses, ainda preenchiam completamente os receptáculos. Fluidos teciduais foram vistos nas camadas superficiais desses materiais, porém, nenhuma invaginação de tecido pode ser observada. O CRCS, apesar de se mostrar o mais estável dos cimentos testados, foi o que apresentou a reação inflamatória mais intensa.

Zmener et al.,¹⁰⁸ em 1988, avaliaram a biocompatibilidade de dois cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex e CRCS) em tecido subcutâneo de ratos. Tubos de silicone com 10 mm de extensão e 1 mm de diâmetro interno, foram preenchidos com os cimentos e implantados em tecido subcutâneo do dorso de ratos. Como controle foram utilizados tubos vazios. A análise da reação tecidual para os materiais e o grupo controle foi realizada histometricamente e

quantitativamente sob microscópio óptico, em períodos de 7, 30 e 90 dias. Até o sétimo dia havia intensa reação tecidual, similar nos dois cimentos; no grupo controle, a reação mostrou-se suave. Em contato direto com os materiais foram observados tecidos necróticos e presença de macrófagos e linfócitos. Leucócitos polimorfonucleares estavam presentes somente no CRCS. Células gigantes tipo corpo estranho com partículas englobadas dos cimentos, foram também vistas nas áreas ao redor das extremidades dos tubos. Aos 30 dias, diferenças significantes entre as áreas de reação tecidual para o Sealapex e CRCS, bem como entre os dois materiais e os controles foram observados. Em contato com o Sealapex, foram encontrados fragmentos de cimento envolvidos por tecido granulomatoso que invaginava em direção à luz do tubo. Macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho contendo muitas partículas negras em seu citoplasma, foram vistas em contato ou à distância das extremidades dos tubos contendo CRCS. Aos 90 dias os espécimes do Sealapex mostraram grandes áreas de reação tecidual, considerando os valores obtidos na medição do CRCS, sendo que no grupo controle havia a presença de um tecido conjuntivo fibroso consistente.

Utilizando cultura de fibroblastos da mucosa bucal humana, em 1989, Arenholt-Bindslev & Horsted-Bindslev⁵ testaram a compatibilidade biológica de 2 cimentos experimentais (ECI e ECII) em

comparação com o AH-26, CRCS, N2, Kloropercha $\text{N}\Phi$ e óxido de zinco e eugenol. Após períodos de 5, 10 e 15 dias, os resultados mostraram através da alteração morfológica, das zonas livres de células e do número de células por cultura através de microscopia óptica, que o cimento mais tóxico foi o N2, nos 3 períodos analisados, enquanto a Kloropercha $\text{N}\Phi$ não apresentou reações tóxicas. Junto ao AH-26 e o ECII, aos cinco dias, notou-se revitalização de algumas células, enquanto no CRCS, ECI e óxido de zinco e eugenol o recobrimento foi completo. Os autores concluíram que a metodologia empregada é um método confiável para a realização de testes iniciais.

Em 1989, Matsumoto et al.,⁵² compararam a citotoxicidade de novos cimentos, New A, New B e New B2 com os seguintes cimentos: AH-26, Diaket, Canals, Tubli Seal e Sealapex. Foram usadas células pulpare de 6 ratos machos Wistar. Os cimentos foram analisados imediatamente após o endurecimento e 6 dias após o armazenamento a 37°C e 100% de umidade. A incorporação de timidina [³H] ao DNA celular, e as alterações morfológicas das células foram microscopicamente examinadas. Os resultados mostraram que os cimentos New A, New B e New B2 recém manipulados mostraram toxicidade mínima na síntese de DNA, o Sealapex também foi pouco inibidor. Houve inibição da síntese de DNA nos cimentos Tubli Seal e Canals; nos cimentos AH-26 e Diaket ocorreu inibição quase que total da

síntese de DNA. Após o endurecimento o New B não alterou a morfologia celular, o New A apresentou uma diminuição da densidade celular, o Diaket causou alteração morfológica dos núcleos. Estes autores constataram in vitro, que os novos cimentos são menos tóxicos em comparação aos cimentos convencionais. No grupo em que os cimentos foram armazenados por 6 dias, a toxicidade aumenta na seguinte ordem: New B, New B2, New A, Sealapex, Canals, Tubli Seal, AH-26 e Diaket; e nos casos de preparo recente, New B, New A, Diaket, Canals AH 26, Tubli Seal e Sealapex no outro grupo.

Em 1990, Al Nazhan & Spangberg¹ estudaram a toxicidade e as alterações morfológicas causadas por 2 cimentos, um à base de óxido de zinco e eugenol e outro à base de polímero, em contato com células L929 e fibroblastos do ligamento periodontal (LPD) de humanos obtidos de pré-molares extraídos por finalidade ortodôntica. A análise foi feita através do método de liberação de cromo, da microscopia eletrônica de transmissão e eletrônica de varredura. Os cimentos foram preparados e colocados em contato com as células, e a avaliação foi feita em períodos de 2 e 4 horas. Os resultados mostraram que havia correlação entre a liberação de cromo e o grau individual de agressão celular. Existem diferenças entre a cultura de fibroblastos do LPD e as células L929, porém não são grandes. A maior diferença está na frequência do complexo de Golgi, sendo menor nas células L929 que em

fibroblastos do LPD. A forma das superfícies das células L929 é recoberta por vesículas e os fibroblastos por microvilosidade. Os fibroblastos do LPD são células menos sensíveis que as L929 quando usadas na avaliação da citotoxicidade.

Bonetti Filho,¹² em 1990, avaliou a biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares: 1) Clássica (Fill Canal), 2) Biológica Controlada (Fill Canal), 3) Com colocação apical de hidróxido de cálcio (Fill Canal) e 4) Clássica (Sealapex). Utilizou oitenta e dois canais de 5 cães. Um alargador de nº 20 foi introduzido no canal radicular até atingir o batente apical e foi iniciado o processo de arrombamento, com um alargador de nº 30, e o limite de perfuração foi de 2,00 mm além do comprimento inicial estabelecido. A instrumentação foi realizada no batente apical, com alargadores e limas Hedström até o nº 60. Os canais foram secos com pontas de papel absorventes e obturados com cones de guta-percha principais e secundários, de acordo com as quatro técnicas mencionadas. Todas as câmaras pulpares foram fechadas com amálgama. Dez canais foram instrumentados mas não foram obturados, para servirem de grupo controle. Após 180 dias, os cães foram sacrificados, as peças descalcificadas, cortadas e coradas com H.E. para análise histológica. As análises dos resultados, através da biocompatibilidade, permitiram a seguinte classificação, de acordo com o grau de sucesso: 1ª) Técnica Clássica (Sealapex), 2ª) Colocação apical

de hidróxido de cálcio (Fill Canal) e Técnica Biológica Controlada (Fill Canal), 3ª) Técnica Clássica (Fill Canal) e 4ª) Grupo Controle.

Meryon & Brook,⁵³ em 1990, estudaram a citotoxicidade dos seguintes cimentos: Kloropercha, Biocalex, Diaket, Endomethasone, AH-26 com e sem prata, Sealapex, Tubli Seal, Pulp Canal Sealer, Forfenan, Spad e pasta Kri. Foram utilizados neste estudo, fibroblastos do ligamento periodontal. A citotoxicidade foi avaliada, com e sem a presença de fragmentos de dentina, obtidos com auxílio de uma peça de mão Micro Mega 3000. Os fragmentos eram compactados até obter-se espessuras de 0.5, 1 e 2 mm. Na ausência de dentina, Kloropercha, Biocalex, Diaket e Endomethasone foram levemente citotóxicos. AH-26 com e sem prata, Sealapex, Tubli Seal e o Pulp Canal Sealer foram moderadamente citotóxicos, enquanto que o Forfenan, Spad e a pasta Kri foram intensamente citotóxicos. Na presença de dentina a citotoxicidade desses materiais foi consideravelmente reduzida, em exceção do Endomethasone, Forfenan, Spad e da pasta Kri.

Em 1990, Takahara et al.,⁹² avaliaram a toxicidade dos cimentos endodônticos New A, New B-1, New B-5, New B-6, Sealapex, Canals, Tubli Seal, Diaket e AH-26 através da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de DNA e a liberação de íons de cálcio. Foram utilizados 30 hamsters Wistar após 1 dia do nascimento como fonte para

colheita das células. Após 24 e 48 horas ocorreu liberação de cálcio nos cimentos New B-1, New B-5 e New B-6, em comparação ao controle, o Sealapex não apresentou diferença significativa. Não houve diferença na síntese de DNA e na atividade da fosfatase alcalina nos períodos de 24 e 48 horas junto aos cimentos New B-1 e New B-5 e o grupo controle, sendo que com o Tubli Seal, Diaket, AH-26, e Canals a diferença foi significativa. O New B-6 causou uma pequena inibição da síntese de DNA e na atividade da fosfatase alcalina, e o New A causou a diminuição dessas funções. Os cimentos AH-26 e Diaket inibiram marcadamente a síntese de DNA e a atividade da fosfatase alcalina. Sealapex, Canals e Tubli Seal inibiram a síntese de DNA e atividade da fosfatase alcalina, sendo que no Sealapex essa atividade foi em menor grau. Após 48 horas de exposição, o New B-1 e New B-5, não causaram mudança na densidade e morfologia das células, as mudanças eram observadas no New B-6 e New A.

Com o objetivo de estudar a citotoxicidade do eugenol nos cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol, Gulati et al.,³⁰ em 1991, injetaram em tecido subcutâneo de cinquenta ratos albinos dois tipos de cimentos, um à base de óxido de zinco e eugenol e outro composto por óxido de zinco e glicerina. Os animais pesavam entre 150 e 200 gramas, e foram observados em períodos de 1, 7 e 15 dias. Para a reação inflamatória do tecido subcutâneo em resposta aos

implantes, foram atribuídos os seguintes escores: grau 1 - resposta inflamatória mínima, grau 2 - resposta inflamatória suave, grau 3 - moderada, grau 4 - severa. A análise microscópica mostrou que, os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol apresentaram no primeiro período resposta inflamatória com neutrófilos dispersos (grau 2). No sétimo dia aumentaram as células inflamatórias crônicas e a quantidade de neutrófilos (grau 3). Aos 15 dias havia densa presença de células inflamatórias (grau 4). Os cimentos à base de óxido de zinco e glicerina mostraram-se menos tóxicos, apresentando reação inflamatória de grau 1 no 1º dia, grau 3 no 7º dia e grau 2 aos 15 dias.

Hong et al.,³² em 1991, estudaram a reação tecidual aos cimentos fosfato de cálcio, Grossman e N2 em canais de dentes de macacos propositadamente sobreobturados. Os autores observaram microscopicamente resposta tecidual 1, 2, 3 e 6 meses após obturação. O cimento de fosfato de cálcio após 1 mês de obturação, apresentou reação inflamatória suave, nos períodos mais longos, neoformação óssea ao redor deste cimento. Os cimentos de Grossman e N2 apresentaram reação inflamatória severa em todos os períodos.

Pissiotis & Spangberg,⁷¹ em 1991, avaliaram a citotoxicidade de um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol (Pulpispad) frente a fibroblastos do ligamento periodontal da

gingiva, de polpa humana e de células L929. O material era incubado nas células por 4 e 24 horas e a toxicidade era avaliada pelo método de liberação de Cr⁵¹. As células utilizadas nesta investigação mostraram graus diferentes de sensibilidade, sendo que as L929 foram as mais sensíveis. O Pulpispad mostrou ser um material endodôntico tóxico ao ser avaliado pelo método do Cr⁵¹, permanecendo tóxico em todos os períodos do estudo.

Briseño & Willershausen,¹³ em 1992, avaliaram a citotoxicidade de 4 cimentos endodônticos (Sealapex, Apexit, CRCS e Endoflas FS), em fibroblastos humanos extraídos de pacientes aparentemente saudáveis, com idade entre 20 e 30 anos. Cada cimento foi deixado sob luz ultravioleta por períodos de 24 e 48 horas após a manipulação para prevenir contaminação bacteriana. Os cimentos foram cobertos com suspensão de cultura de fibroblastos. O cálculo da quantidade de incorporação de L-[¹⁴C] leucina pelos fibroblastos após entrarem em contato com os cimentos, foi utilizada para determinar o potencial de síntese protéica dos mesmos, em períodos de 1, 3, 5, 11, 13 e 21 dias. Os resultados mostraram, que o Endoflas FS no grupo 24 horas induziu redução no potencial de síntese protéica dos fibroblastos, e no grupo 48 horas mostrou alta citotoxicidade quando comparado aos outros cimentos. O Sealapex demonstrou citotoxicidade relativamente pequena após 3 dias. O CRCS mostrou citotoxicidade alta durante a fase inicial,

tendo decaído depois de 3 dias de cultivo. O Apexit apresentou alta toxicidade na fase inicial, mas um ascendente grau de incorporação de L-[¹⁴C] leucina em fibroblastos pode ser distinguida depois de 3 dias.

Leonardo,⁴⁸ em 1992, fez avaliação microscópica da reação apical e periapical em pré-molares de cães, frente aos cimentos Sealapex e CRCS. Foram utilizadas 16 raízes de pré-molares inferiores de animais com um ano de idade. Os dois cimentos causaram inflamação crônica de magnitude moderada e induziram a deposição de tecido mineralizado na região apical. No grupo obturado com Sealapex notou-se interposição de tecido fibroso entre o material e o tecido mineralizado, já no grupo do CRCS, a deposição de tecido duro se deu diretamente sobre a superfície do material.

Molloy et al.,⁵⁷ em 1992, avaliaram microscopicamente a biocompatibilidade de um cimento experimental, em comparação com o Sealapex, AH-26, Roth Canal Sealer e cimento Kerr. A observação foi feita por períodos de 3, 10, 20, 30 e 60 dias. Os cimentos após manipulados eram introduzidos em tubos de polietileno, em seguida estocados em 100% de umidade por 48 horas, após este período foram implantados em tecido subcutâneo de 10 ratos Sprague-Dawley. Segundo os autores, até cada período de tempo não foi possível distinguir nenhuma diferença na resposta tecidual de todos os cimentos, com

exceção do AH-26 até o período de 30 dias. Aos 60 dias, todos os cimentos mostraram-se biocompatíveis.

Com o objetivo de avaliar microscopicamente "in vivo" a biocompatibilidade de dois cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, Perlot et al.,⁶⁶ em 1992, implantaram em mandíbulas de coelhos tubos de silicone contendo o Sealite e o Pulp Canal Sealer. Os animais foram sacrificados após períodos de 4 e 12 semanas, e então efetuados os procedimentos histológicos de rotina. No período inicial de 4 semanas a reação inflamatória foi considerada leve em 4 espécimes e moderada em 2 no grupo Sealite; no grupo Pulp Canal Sealer 5 foram considerada leves e 1 moderada. Decorridas 12 semanas o grupo Sealite apresentou em 4 espécimes reação inflamatória muito leve, e leve em 2, o mesmo ocorreu no grupo Pulp Canal Sealer. Diante dos resultados os autores concluíram que os 2 cimentos apresentaram boa compatibilidade biológica.

Araki et al.,³ em 1993, avaliaram microscopicamente a citotoxicidade de 2 cimentos endodônticos, que apresentavam a composição parte sólida (pó) à base de óxido de zinco. Os cimentos foram divididos em 3 grupos experimentais: recém manipulados, 24 e 168 horas após a espatulação. A composição do pó era igual nos 2 nos grupos, alterando-se apenas parte líquida. Em um dos grupos foi utilizado eugenol e no outro ácido graxo. As amostras foram incubadas por 4 e 24

horas em contato direto e indireto com células L929. A toxicidade foi avaliada usando-se leitura de liberação de Cr^{51} . Em contato direto os cimentos foram citotóxicos quando recém manipulados ou após 24 horas. Após uma semana o cimento à base de eugenol ainda era tóxico, enquanto que no cimento à base de ácido graxo não houve diferença significativa do grupo controle em relação ao grupo de 4 horas após o seu preparo. No contato indireto os materiais mostraram pouca citotoxicidade, aqui somente o cimento à base de óxido de zinco e eugenol recém preparado foi claramente citotóxico após 24 horas.

Barbosa et al.,⁷ em 1993, estudaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos Sealer 26, Fill Canal, N-Rickert, pasta FS por meio do método de liberação do Cr^{51} . Células L929 de camundongos e fibroblastos do ligamento periodontal de humanos foram utilizadas neste estudo. A avaliação foi feita logo após a manipulação e a 1, 7 e 14 dias. Os resultados permitiram concluir que a pasta, e todos os cimentos recém manipulados, em contato direto com as células apresentavam alta citotoxicidade. Após 24 horas os melhores resultados foram conseguidos pelo Sealer 26 e pasta FS. Aos 7 dias o Fill Canal mostrou a mais alta toxicidade e aos 14 dias o N-Rickert foi o mais tóxico, seguido do Fill Canal, pasta FS e Sealer 26.

Em 1993, Buntak-Klober et al.,¹⁴ examinaram a

possibilidade de impacto tóxico dos cimentos Sealapex e Apexit em comparação com o Diaket. Em 52 camundongos fêmeas das linhagens C-57 e BL-6, foram injetados nas caudas 0,5 cc dos cimentos recém preparados, e como grupo controle foi injetado Hanks (corante). Os animais foram sacrificados após períodos de 2, 8 e 30 dias. A análise microscópica mostrou que, aos 2 dias havia uma inflamação aguda nos grupos Apexit e Sealapex, e leve hiperemia junto ao grupo controle. Após 8 dias no grupo do Apexit havia necrose da epiderme, início de necrose do tecido subcutâneo e ulceração da pele. O grupo do Sealapex, apresentou grandes áreas de necrose no tecido subcutâneo e muscular. No grupo Diaket, ocorreu infiltrado inflamatório denso na pele, tecido subcutâneo e em todo o periósteo. No grupo controle observou-se a presença de infiltrado inflamatório com presença de poucos linfócitos. Aos 30 dias, o grupo Apexit apresentou uma inflamação crônica granulomatosa com células gigantes do tipo corpo estranho e minúsculas áreas de necrose no tecido subcutâneo. No grupo Sealapex houve regeneração óssea semelhante a um calo ósseo inicial e necrose no tecido subcutâneo. O grupo Diaket, aos 30 dias, apresentou necrose, osteomielite, granuloma de células gigantes e material encapsulado por fibras.

Camargo,¹⁵ em 1993, analisou em subcutâneo de ratos em períodos de 4, 8, 12, 24, 30 e 40 dias a interação dos macrófagos

com os cimentos Sealapex e CRCS. Foram utilizadas lâminulas circunferenciais que continham cimento na porção central. Após o sacrifício dos animais nos diferentes períodos as lâminulas eram removidas, coradas e analisadas microscopicamente. O CRCS mostrou-se compatível em todos os períodos do experimento, já o Sealapex apresentou alterações nos períodos de 4, 8 e 12 dias, mostrando-se compatível nos períodos restantes.

A citotoxicidade do hidróxido de cálcio contido nos cimentos Sealapex, CRCS e Apexit foi testada por Beltes et al.,⁸ em 1995, em culturas de células L929 e BHK 21/C13 (fibroblastos de ratos Kidney recém nascidos). O meio de cultura Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina foi utilizado para manutenção das células. As culturas eram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Os cimentos, após preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, foram avaliados microscopicamente em períodos de 24, 48 e 72 horas. Em relação às células L929, o Sealapex mostrou o maior grau de toxicidade nos 3 períodos do experimento, seguido do CRCS e Apexit. Frente as células BHK 21/C13 todos os cimentos mostraram-se mais citotóxicos em todos os períodos do experimento, o Sealapex apresentou a maior toxicidade, seguido do CRCS e Apexit.

Gerosa et al.,²⁷ em 1995, avaliaram a citotoxicidade de seis cimentos endodônticos, o AH-26, Pulp Canal Sealer, Rocanal R2, Rocanal R3, Bioseal e Endomethasone, em culturas de fibroblastos humanos obtidos da região dos terceiros molares. Os cimentos foram utilizados após períodos de uma e duas semanas preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. Os testes foram realizados em períodos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados apresentaram o Pulp Canal Sealer como sendo de baixa citotoxicidade, o Endomethasone, Bioseal e ROCANAL R3 de moderada, ROCANAL e AH-26 de alta toxicidade, que foi atribuída aos componentes O-fenilfenol e a resina epóxi bisfenol, respectivamente como sendo a causa dessa citotoxicidade.

Mital et al.,⁵⁵ em 1995, avaliaram a citotoxicidade de 4 cimentos endodônticos (óxido de zinco e eugenol, Tubli Seal, Sealapex e Endoflas FS), em tecido subcutâneo de 15 hamsters. Os cimentos foram preparados em uma consistência capaz de fluir por uma agulha calibre 18. Em seguida foram injetados nas regiões, escapular, pélvica, lado direito e esquerdo, e na região central da superfície dorsal; como controle foi usada solução salina. A análise foi feita em períodos de 48 horas, 7 e 14 dias, 1 e 3 meses, através de microscopia óptica. No período inicial de 48 horas, o óxido de zinco e eugenol, Tubli Seal, Endoflas FS apresentaram reação inflamatória severa. O Sealapex apresentava intensidade moderada, e o grupo controle leve. A população celular

observada foi de leucócitos polimorfonucleares. Após 7 dias persistia a resposta inflamatória severa perante ao óxido de zinco e eugenol, Tubli Seal e Endoflas FS, leve ao Sealapex, e sem inflamação no grupo controle. A reação inflamatória tinha tornado-se localizada com o Sealapex e Endoflas FS. Linfócitos foram os principais componentes, seguidos pelos leucócitos polimorfonucleares. Após 14 dias a inflamação estava localizada para todos os cimentos, tornando-se moderada exceto para o Sealapex, que era suave. Macrófagos eram as células predominantes, havendo poucas células gigantes do tipo corpo estranho junto ao Sealapex e Endoflas FS. Os fibroblastos se mostravam distribuídos de forma compacta e regularmente. Um mês após, a inflamação moderada persistia no Tubli Seal e Endoflas FS, junto ao Sealapex e ao óxido de zinco e eugenol a inflamação era suave. Nesse período foi observada a degradação dos cimentos e formação de cápsula fibrosa. Aos 3 meses não havia inflamação em nenhum dos cimentos, os quais exibiam cápsula fibrosa espessa.

Em 1995, Silva⁸⁵ utilizou 80 canais radiculares de 4 cães, com vitalidade pulpar. Os dentes após o preparo biomecânico foram obturados pela técnica clássica com os cimentos: Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Apexit. Após 180 dias os animais foram sacrificados e as peças encaminhadas para o processamento histológico. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina e pelo Tricrômico de Mallory. A

análise histopatológica mostrou que o Sealapex foi o cimento que melhor permitiu a deposição de tecido mineralizado, em nível apical, sendo o único a apresentar selamento do tipo completo (37,5% das amostras). No grupo Sealapex infiltrado inflamatório estava ausente/suave, não foi observada reabsorção ativa dos tecidos mineralizados. No grupo CRCS, o selamento apical foi parcial, e houve presença de infiltrado inflamatório moderado. Nos grupos Apexit e Sealer 26, o selamento apical estava ausente, havendo reabsorção ativa dos tecidos mineralizados, na maioria dos casos, sendo que o grupo Apexit apresentou infiltrado inflamatório do tipo severo, no Sealer 26 o infiltrado inflamatório estava ausente ou era do tipo suave. Para o estudo da resposta inflamatória foram utilizados 80 camundongos isogênicos Balb/C fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, de 20 cada um, nos quais foram injetadas suspensões dos cimentos obturadores à base de hidróxido de cálcio no tecido conjuntivo subcutâneo dos camundongos. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados nos períodos de 2, 4, 8 e 16 dias, sendo as lesões, após excisão, fixadas por 24 horas em formalina fosfatada tamponada. Após o processamento histológico, os tecidos foram incluídos em metacrilato, cortados em 2 micrômetros de espessura e corados com H-E like. Os resultados mostraram que, nas primeiras 48 horas, ocorreu intenso infiltrado de leucócitos polimorfonucleares nos 4 cimentos estudados, sendo mais acentuado na Apexit e CRCS. Já no oitavo dia, isto é, na fase intermediária, constatou-

se intensa redução dessas células, principalmente no Sealapex, seguido pelo Sealer, CRCS e Apexit, com o aumento marcante de células do Sistema Mononuclear Fagocitário. Na fase tardia, a maior diferenciação celular ocorreu no Sealapex, tendo sido encontrada no Apexit uma menor quantidade de diferenciação. No Sealer 26, embora tenha ocorrido intensa migração e diferenciação celular, a mesma foi acompanhada de necrose durante todo o período experimental. Necrose tecidual foi observada, também no Apexit e no CRCS, também acompanhada de processo inflamatório, moderado/severo, e reduzida diferenciação celular.

Torabinejad et al.,⁹⁵ em 1995, testaram a citotoxicidade de 4 materiais utilizados em retroobturações, o amálgama, Super EBA, IRM e o MTA. A análise foi feita através do método radiocrómio (Cr^{51}) após 24 horas de incubação em células L929. O grau de citotoxicidade foi menor para o MTA seguido do amálgama, Super EBA e o IRM.

A reação tecidual aos cimentos Super EBA e MTA implantados em mandíbula de Porcos da Índia, foi estudada por Torabinejad et al.,⁹⁶ em 1995. Após o período de 60 dias de implantação o MTA apresentou reação inflamatória mais suave que a observada no Super EBA, mesmo assim de acordo com os resultados os cimentos foram considerados biocompatíveis pelos autores, sendo que os critérios histológicos definidos para essa avaliação foram assim discriminados:

presença de tecido conjuntivo fibroso ou formação óssea contra o material, inflamação, células inflamatórias, macrófagos, células gigantes e espessura do tecido conjuntivo fibroso adjacente ao material.

Para avaliar a citotoxicidade do eugenol puro, Gerosa et al.,²⁸ em 1996, um método *in vitro* foi utilizado para determinar o máximo de concentração não citotóxica, de soluções de eugenol e álcool etílico solublizadas em água. A citotoxicidade do álcool era determinada usando uma dose resposta, por curva de concentração entre 0.017 M e 1.7 M. Várias concentrações (0.015 a 947 μ M) de eugenol em álcool foram preparadas. Vinte μ l (0.34 M) de álcool etílico foram adicionados a 1 ml do meio de cultura de células do fibroblasto gengival humano, obtidas de biópsias gengivais humanas. Foi verificado que o eugenol puro é citotóxico ao fibroblasto gengival humano. O eugenol diluído na solução alcoólica em uma concentração menor 1.9 μ M não é citotóxico. O eugenol puro é citotóxico e representa um dos ingredientes responsáveis pela citotoxicidade nos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol. É preciso e se faz necessário investigar adiante ou no futuro para compreender quais componentes são tóxicos e a que concentrações elas podem ocorrer.

A citotoxicidade dos cimentos endodônticos Finapex APC, Sealapex, Canals, Canals N, foi avaliada em culturas de macrófagos

peritoneais de ratos através de microscopia eletrônica de varredura, por Maseki et al.,⁵¹ em 1996. Os cimentos foram analisados após períodos de 30, 60 e 120 minutos em contato com as células. Após os períodos de tempos de 30 e 60 minutos, o grau de citotoxicidade era maior na seguinte ordem: Finapec APC, canals N, Sealapex e Canals. Aos 120 minutos o grau de citotoxicidade aumentava na seguinte ordem: Finapec APC, Sealapex, Canals N e Canals.

Tanomaru Filho,⁹³ em 1996, avaliou radiográfica e histologicamente a reparação apical e periapical de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, empregando duas diferentes técnicas de neutralização do conteúdo séptico-tóxico do canal radicular de dois diferentes cimentos obturadores durante o tratamento endodôntico. Foram utilizados canais radiculares de pré-molares superiores e inferiores de cinco cães, os quais foram expostos ao meio bucal por sete dias, sendo, a seguir, realizado o selamento das cavidades oclusais com o objetivo de induzir as lesões periapicais. Após a constatação radiográfica das lesões, foi realizado o tratamento endodôntico. A neutralização foi realizada pelo método mediato, com o emprego do tricresol formalina, seguido do preparo biomecânico utilizando líquido de Dakin à 0,5% como solução irrigadora, ou pelo método imediato, no qual foi empregada a soda clorada 4 a 6% durante a irrigação. Para a obturação, foram utilizados os cimentos Fill Canal ou Sealapex, definindo os quatro grupos

experimentais. Ao final da obturação dos canais radiculares e após 270 dias, foram realizadas radiografias padronizadas para análise radiográfica do reparo das lesões. Ao final de 270 dias após a obturação, os animais foram sacrificados e encaminhados para o processamento histológico; os cortes foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina, Tricrômico de Mallory e Brow e Brenn. A análise radiográfica do reparo das lesões não demonstrou diferença estatística entre as técnicas de neutralização ou cimentos empregados. A avaliação histopatológica dos reparos apical e periapical evidenciou que não houve diferença significativa entre as técnicas de neutralização do canal radicular. Porém, houve influência significativa do cimento obturador, com melhores resultados de reparo apical e periapical nos grupos onde foi empregado o cimento Sealapex. Menor presença bacteriana foi observada nos grupos obturados com Sealapex.

Almeida,² em 1997, avaliou histologicamente a resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, após biopulpectomia e obturação dos canais radiculares com os cimentos Ketac Endo, Fill Canal e AH Plus. O cimento Ketac Endo, foi avaliado após 270 dias tendo como controle o cimento Fill Canal, e o cimento AH Plus foi avaliado após 90 dias. O Ketac Endo não apresentou selamento apical total em nenhum dos casos de selamento parcial o tecido conjuntivo intersticial, contido entre as paredes do selamento neoformado apresentava infiltrado

inflamatório mononuclear suave/moderado, poucas fibras colágenas, edema e poucos cementoblastos junto à parede do selamento. Em contato com o cimento obturador, havia necrose superficial e congestão vascular. Nos casos de ausência de selamento, o tecido intersticial apresentava, também áreas de necrose em contato com o material obturador, e moderado/severo infiltrado inflamatório mononuclear que se estendia até o periápice. No grupo Fill Canal após 270 dias, nos casos de selamento parcial o tecido intersticial invaginado para o interior do canal radicular apresentava poucos fibroblastos e fibras colágenas e quando em contato com o material obturador, havia necrose e infiltrado inflamatório moderado, constituído predominantemente por células mononucleares. A região periapical apresentava resposta inflamatória de intensidade moderada/suave, constituída por células mononucleares, edema, poucos fibroblastos e fibras colágenas. No AH Plus após 90 dias, nos casos de selamento parcial, o tecido intersticial apresentava numerosos fibroblastos, intensa presença de fibras colágenas e ausência de células inflamatórias, exceto raros macrófagos, e as ramificações do delta apical apresentavam tecido conjuntivo íntegro. O Fill Canal após 90 dias na região periapical evidenciava resposta inflamatória de intensidade moderada/severa, edema, poucos fibroblastos e fibras colágenas dissociadas.

A biocompatibilidade e a infiltração apical de cimentos

obturadores à base de fosfato tricálcio, (Sankin Apatite tipo I, II e III) e do cimento de Grossman, foram investigadas por Bilgner et al.,¹⁰ em 1997. Tubos de teflon contendo os cimentos recém manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes foram implantados em subcutâneo de 31 hamsters, pesando 35 gramas. Cada animal recebeu 4 implantes, que foram observados por períodos de 24 horas, 7 e 30 dias. Após estes períodos, as áreas de tecido reacional aos implantes foram avaliadas histologicamente. Os resultados segundo os autores mostraram que a severidade da reação tecidual dentre os materiais testados diminuía com o tempo, e que os Sankin Apatite tipo II e III eram mais biocompatíveis que o tipo I e o cimento de Grossman. No grupo controle uma cápsula fibrosa era observada ao redor dos implantes.

Garcéz-Ortiz & Ledesma-Montes,²⁶ em 1997, investigaram o efeito do cimento ionômero de vidro (Ketac Silver) em tecido pulpar. Após a aprovação do protocolo pela comissão de ética da Escola de Odontologia da Universidade Nacional do México e de acordo com as normas federais, 60 pré-molares de humanos indicados para extração por motivos ortodônticos, foram utilizados neste estudo. Em todos os dentes foram preparadas cavidades tipo classe V, e uma base de hidróxido de cálcio (Dycal) foi colocada em cada cavidade. Trinta dentes foram obturados com Ketac Silver e 30 com óxido de zinco eugenol. Dez dentes de cada grupo, foram extraídos em períodos de 25, 30 e 60 dias e

encaminhados para o processamento histológico, sendo as lâminas coradas através da H/E e observadas em microscópio Axiophot ZEISS, sendo que a avaliação das reações pulpares foi feita de acordo com a especificação nº 41 da ADA/ANSI, que recomenda normas de standardização para avaliação biológica de materiais dentários. Após 15 dias, a polpa dos dentes no grupo Ketac apresentou vacuolização e ruptura da camada odontoblástica, edema, vasodilatação, infiltrado inflamatório crônico e necrose. Aos 30 dias, havia necrose da camada odontoblástica, infiltrado inflamatório severo e extensas áreas de necrose. No período final, 60 dias, o tecido pulpar apresentava-se completamente necrótico. No grupo do óxido de zinco e eugenol, após 15 dias camada de odontoblastos permanecia organizada. Aos 30 e 60 dias, a camada de odontoblastos permanecia organizada sem alteração do tecido pulpar e havia formação de dentina.

Leonardo et al.,⁴⁷ em 1997, avaliaram histologicamente o reparo apical e periapical após o tratamento endodôntico em 80 dentes de cães. Foram analisados os cimentos: Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Apexit. Decorridos 180 dias da obturação dos canais radiculares os animais foram sacrificados, as mandíbulas e as maxilas removidas, e fixadas em formol a 10,0%. Após o processamento histológico os cortes foram corados pelo tricrômico de Mallory e hematoxilina eosina. Segundo os autores, o Sealapex permitiu a deposição e mineralização em nível

apical em 37,5% dos casos, não sendo observado a presença de infiltrado inflamatório e áreas de reabsorção dos tecidos mineralizados. O CRCS apresentou selamento parcial e presença de infiltrado inflamatório moderado. Nos grupos Apexit e Sealer 26 havia ausência de selamento e ativa reabsorção de tecido mineralizado ocorreu na maioria dos casos. O infiltrado inflamatório presente no Apexit era do tipo severo, no Sealer 26 o infiltrado inflamatório era suave ou ausente.

A citotoxicidade de cinco cimentos endodônticos, o Sealapex, Sealer 26, Apexit, CRCS e Fill Canal foi avaliada em cultura de macrófagos em períodos de 1, 12, 24, 48 e 72 horas por Leonardo,⁴⁹ em 1997. Para as alterações morfológicas na avaliação microscópica utilizaram-se os seguintes critérios: forma celular: monocitária, fusiforme e/ou estrelada, plasmocitoide; aspecto do citoplasma: homogêneo, denso, vacuolado, com material, fagocitado; aspecto do núcleo: vesiculoso, denso, nucléolo evidente ou não; distribuição celular: aleatória, aglomeradas, permaterial; aspecto morfológico do material: forma granular, cor, regularidade, distribuição e para liberação de H₂O₂ utilizou-se a metodologia da oxidação do vermelho fenol pela H₂O₂, mediada pela enzima peroxidase de raiz forte, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos, onde o grau de liberação de H₂O₂ está correlacionado com o grau de agressão e segundo a metodologia pode-se ler por um medidor de Elisa e nível de agressão dos cimentos testados. Quanto às

alterações morfológicas, todos os cimentos foram citotóxicos, numa ordem crescente de toxicidade, foram mais agressivos que o controle o Fill Canal, CRCS, Sealer 26, Apexit e Sealapex. Quanto a liberação de H_2O_2 a ordem crescente de toxicidade foi Sealer 26, Fill Canal, Apexit, Sealapex e CRCS.

Com a finalidade de estudar comparativamente a biocompatibilidade de 2 cimentos, um à base de ionômero de vidro hidrofílico, Dyract, e outro à base de óxido de zinco, Super EBA, Pertot et al.,⁶⁷ em 1997, implantaram tubos de silicone contendo os cimentos em fêmur de 24 coelhos. Os animais foram sacrificados em períodos de 4 e 12 semanas e encaminhados para o processamento histológico. Após quatro semanas os materiais apresentavam pequena ou moderada reação inflamatória, classificadas de acordo com critérios e notas para as reações assim discriminadas: 0 = nenhuma reação, 1-3 = reação suave, 4-6 = reação moderada, 7-9 = reação severa, caracterizada pela presença de tecido fibroso e interposição de células inflamatórias. No período de 12 semanas, ocorreu a cura do osso a despeito da persistência da presença de interposição de tecido fibroso e reação inflamatória leve. A análise estatística não apresentou diferença significativa entre os dois cimentos.

Em 1997, Rasquin⁷⁴ fez avaliação histopatológica da

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

Silva et al.,⁸⁶ em 1997, avaliaram a resposta inflamatória do Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26 em tecido subcutâneo e cavidade peritoneal de ratos Balb/C. A resposta inflamatória em subcutâneos foi avaliada após 2, 4, 8 e 16 dias. Intensa neutrofilia foi apresentada por todos os cimentos no período inicial. As diferenças realizadas foram, a presença de necrose e o número de células inflamatórias. A reação inflamatória observada no tecido subcutâneo, foi caracterizada pela presença de intensa infiltração celular de grandes quantidades de leucócito polimorfonucleares como resposta para todos os cimentos. Na cavidade peritoneal, apresentou um significativo aumento no número de neutrófilos caracterizado por um aumento não somente em polimorfonucleares, mas também em células mononucleares (macrófagos

e linfócitos). Na fase intermediária há a diferenciação de fagócitos mononucleares em macrófagos, células epitelioidais e células gigantes eram observadas no Sealapex. A resposta foi menos intensa no CRCS e Apexit. Na cavidade peritoneal a avaliação foi feita após 6, 24 horas e 5 e 15 dias. Durante o período inicial era intensa a migração de leucócitos polimorfonucleares na cavidade peritoneal em resposta aos cimentos em comparação ao controle. A migração era mais intensa no Sealer 26 e Apexit. O aumento no número de células mononucleares foi observado após 6 e 24 horas, e 5 dias, por todos os cimentos. Não observou-se diferenças em relação ao grupo controle após 15 dias.

Vajrabhaya & Sithisarn,¹⁰⁰ em 1997, avaliaram a citotoxicidade de 6 cimentos obturadores de canal radicular (Apexit, AH-26, MU Sealer, ROCANAL 2, ROCANAL 3, Endomethasone), em culturas monolinesares e multilinesares de fibroblastos de ratos. As culturas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 100% de umidade, em meio de Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina G 200 µl⁻¹ + estreptomicina 200 µg/ml⁻¹ + fungizone 2 µg/ml⁻¹). As concentrações eram de 5 x 10⁵ células nas culturas monolinesares e 1 x 10⁶ células nas culturas multilinesares. Os cimentos eram incubados por 4 horas junto às células, em seguida feita a análise através da liberação de Cr⁵¹. Os resultados mostraram que o ROCANAL 3, ROCANAL 2, Endomethasone e o MU Sealer não apresentaram diferença estatística

entre eles, porém estes materiais foram mais tóxicos que o AH-26 e o Apexit. Comparando-se as culturas monolinesares e multilinesares não houve diferença estatística entre a percentagem de células viáveis.

Em 1997, Vajrabhaya et al.¹⁰¹ compararam 2 métodos de avaliação da citotoxicidade, cujo objetivo foi avaliar a resposta em culturas multilinesares comparada com uma cultura monolinesar de células de fibroblastos, na perspectiva de que a cultura de células multilinesares possa simular o tecido periapical humano melhor que as monolinesares, utilizando 6 cimentos (MU - Mahidol University, ROCANAL 2, ROCANAL 3, Apexit, Endomethasone e AH-26). Foram utilizados os métodos de coloração com sulforodamina B e liberação de Cr⁵¹, em culturas de células monolinesares (5×10^5) de ratos. Após a incubação a 37°C em 5% de CO₂ por 24 horas na presença dos cimentos, as células eram coradas pela sulforodamina B, e feita a leitura através de um espectrofotômetro com um filtro de 540 nm para determinar a quantidade de células viáveis, em seguida, foi realizado o teste de liberação de Cr⁵¹. Os resultados mostraram que através da coloração com o sulforodamina B apenas o Apexit não foi citotóxico, já através do método de liberação de Cr⁵¹ nenhum cimento mostrou-se citotóxico, deixando claro que os dois métodos são capazes de produzir resultados diferentes.

Kolokouris et al.,³⁷ em 1998, avaliaram através de tubos

de teflon contendo cimentos no seu interior, implantados no tecido conjuntivo subcutâneo de 44 camundongos fêmeas wistar, a biocompatibilidade de dois cimentos obturadores de canais radiculares, o Apexit à base de hidróxido de cálcio, e o Pulp Canal Sealer à base de óxido de zinco e eugenol. Estes cimentos, devidamente manipulados, foram inseridos em tubos de teflon para então serem implantados no dorso dos animais. Os implantes foram removidos depois de 5, 15, 60 e 120 dias, fixados e preparados para avaliação microscópica. Observaram uma reação inflamatória com extensões necróticas para o Apexit no quinto e décimo quinto dias, porém a intensidade desta reação diminuiu no septuagésimo dia chegando a um nível mínimo no vigésimo dia, caracterizado pela presença de tecido conjuntivo com poucos macrófagos. Resultados semelhantes ocorreram com o Pulp Canal Sealer, onde verificaram uma reação inflamatória nos períodos finais pouco maior do que ocorreu para o Apexit.

Koulaouzidou et al.,³⁹ em 1998, avaliaram "in vitro" a citotoxicidade, em dois tipos de linhagem celular, às L929 fibroblastos gengival de ratos e RPC-C2A de células da polpa de ratos, de três cimentos endodônticos à base de resina (AH26, AH Plus e Topseal). O cimento endodôntico ideal deveria ter, entre outras características, uma boa capacidade seladora e biocompatibilidade. Ambas características importantes para o sucesso clínico do tratamento endodôntico. Hoje,

temos vários tipos de cimentos endodônticos, os quais estão divididos em: não contendo eugenol, contendo eugenol e à base de hidróxido de cálcio. Nas categorias dos cimentos que não contém eugenol, temos os cimentos à base de resina plástica, como o AH26. Recentemente a Dentsply/DeTrey desenvolveu uma nova fórmula para o AH Plus. Também a Dentsply/Maillefer introduziu o Topseal que contém a mesma formulação do AH Plus. Os testes foram realizados "in vitro" com células L929. O AH26 mostrou-se severamente citotóxico quando comparado ao AH Plus e Topseal, os quais similarmente, mostraram uma baixa citotoxicidade.

Ersev et al.,²² em 1999, avaliaram a citotoxicidade (células L929) e mutagenicidade (teste Ames) de vários cimentos endodônticos in vitro. A atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos que contém substâncias como o paraformaldeído, eugenol e timol, ajudam a destruir algumas bactérias remanescentes. Por outro lado, severa toxicidade de um cimento endodôntico pode levar a danos teciduais. O cimento à base de resina, AH26, causou severa irritação nos períodos iniciais de observação. Cimentos à base de hidróxido de cálcio mostraram leve para moderada infiltração tecidual. No teste de mutagenicidade (Teste de Ames), o cimento à base de resina AH26 mostrou potencial genotóxico, o qual foi atribuído a um componente da fórmula, o Diglicidil éter bisfenol-A. Em contraste para esses achados, um cimento de canal radicular, à base de ionômero de vidro (Ketac-Endo) foi

compatível-tecidual, com uma reação inflamatória suave após exposição por 5 dias.

Leonardo et al.,⁴³ em 1999, avaliaram a resposta tecidual de um cimento endodôntico à base de resina epóxi, o AH Plus, o qual foi comparado ao Fill Canal (à base de óxido de zinco e eugenol). Trinta e quatro pré-molares de cães foram usados. Depois da instrumentação, os canais radiculares foram obturados com guta-percha e com os cimentos citados, utilizando a técnica da condensação lateral. Após todos os procedimentos histológicos, não observaram células inflamatórias nem áreas de necrose associadas ao cimento AH Plus. Formação de tecido duro apicalmente ao material foi observado em 14 espécies, nas paredes dos canais radiculares e no ápice da raiz. Já o Fill Canal apresentou uma resposta inflamatória de intensidade moderada na região periapical, no ligamento periodontal principalmente adjacente ao material.

Leonardo et al.,⁴⁵ em 1999, avaliaram a liberação de formaldeído por quatro cimentos endodônticos, pois a literatura mostra que alguns cimentos como o Endomethasone e o N₂, que contém formaldeído, podem causar necrose tecidual e inflamação, embora, lentamente ocorre a reparação. Outros cimentos como o AH26, não contém formaldeído na fórmula, mas através de uma reação química após misturado (envolvendo dois componentes: resina bisfenol A e

hexametilenotetramina), ocorre a liberação de formaldeído. Neste trabalho foi utilizado um espectrofotômetro (Hitachi modelo U-3501) para verificar a liberação de formaldeído dos cimentos Endomethasone, AH26, AH Plus e Topseal. Os autores observaram que o AH Plus e o Topseal liberaram um mínimo de formaldeído, estatisticamente insignificante quando comparado aos demais.

Segura et al.,⁸¹ em 1999, investigaram em macrófagos peritoneais de ratos Wistar, o efeito do bisfenol A (B.P.A.) na capacidade de aderência dos macrófagos. O diglicidil éter de bisfenol A (BADGE) é um ingrediente de alguns cimentos endodônticos como o AH 26. É sabido que os macrófagos além da fagocitose, produzem diversas substâncias ativas biologicamente (como as enzimas, prostaglandinas e citocinas); e interagem com outras células e componentes extracelulares por meio de receptores de adesão. Adesão é o primeiro passo para o processo da fagocitose pelos macrófagos. O resultado deste trabalho mostrou que o B.P.A., pode alterar a capacidade de adesão dos macrófagos, podendo inibir a função e a modulação da resposta imune e inflamatória na polpa dentária e nos tecidos periapicais.

Cohen et al.,¹⁷ em 2000, avaliaram "in vitro" a determinação da citotoxicidade de dois cimentos obturadores de canais radiculares (AH 26 e AH Plus). Este teste de citotoxicidade (teste de

difusão no ágar) foi feito baseando-se em procedimentos descritos pela Organização Internacional de Padronização. A reatividade biológica da monocamada mamaliana, L929 de células fibroblásticas de ratos em resposta aos agentes testados foi determinada. Depois de um período de 48 horas de observação, a cultura de células expostas nos discos dos artigos testados para AH26 e AH Plus exibiu uma reatividade severa (grau 4). O controle positivo do artigo exibiu uma reatividade moderada (grau 3). Nenhum sinal de reatividade (grau 0), foi observado para o artigo controle negativo ou para os discos controles negativo. As amostras testadas de AH26 e AH Plus são consideradas citotóxicas e não possuem o requerido no teste de difusão de ágar. Resultados semelhantes de citotoxicidade, foram encontrados na literatura para o AH26 e para outro cimento obturador de canal radicular.

Willershausen et al.,¹⁰⁴ em 2000, avaliaram "in vitro" a biocompatibilidade biológica de cinco cimentos obturadores de canal radicular (Sealapex, Endion, Super-EBA, Ketac-Endo e AH Plus) e cones regulares de guta-percha composto de hidróxido de cálcio, em três diferentes linhagens de células humanas. Culturas sem cimentos obturadores de canal radicular foram usados como controle. Células de crescimento, morfologia celular, viabilidade celular, células contendo proteínas e prostaglandina E₂ (PGE₂) liberável foram usadas como parâmetros para determinar a "citotoxicidade" destes materiais. A

proteína contendo três linhagens de células - fibroblasto nasal, fibroblasto gengival e células de tumor epitelial, foi significativamente reduzida ($p \leq 0.001$) para todos os materiais testados. Determinações de PGE_2 liberável mostrou diferenças específicas significantes nos materiais. Variações de valores não significantes de PGE_2 , liberáveis foram encontrados com Sealapex, Endron e Super EBA. Ao contrário aumentos significantes de PGE_2 , foram medidos nos níveis com Ketac Endo, AH Plus e cones regulares de guta-percha composta a base de hidróxido de cálcio ($p \leq 0.001$).

Proposição

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

- Avaliar a resposta celular bioquímica dos macrófagos frente aos cimentos Topseal, Kerr Pulp Canal Sealer EWT (Extended Working Time), Tubli-Seal™ e EndoREZ™, tendo-se como parâmetro o nível de liberação ou quantificação de H_2O_2 e NO liberado no meio de cultura dessas células.

Material e método

1. Preparo e obtenção dos animais para a reação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Nessa metodologia de dosagem de H₂O₂ foram utilizados 11 camundongos Swiss, machos, de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Os animais durante os testes foram mantidos em gaiolas, recebendo ração balanceada e água "ad libitum", por um período de 96 horas.

Cada camundongo serviu de fonte de macrófagos peritoneais para cada cultura.

A morte dos animais era realizada separadamente, para todos os experimentos, por asfixia respiratória, em cuba de vidro contendo no seu interior algodão embebido em éter sulfúrico.

2. Preparo dos cimentos

Os cimentos experimentados foram espatulados de acordo com os fabricantes e da seguinte forma:

- **Cimento Topseal:** por ser cimento do tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocados em partes iguais (6 cm) de pasta de base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro, e com auxílio

de uma espátula metálica nº 24, incorporou-se um ao outro até obter-se uma mistura homogênea. As placas contendo o cimento já preparado foram armazenadas por 48 horas em cubas metálicas, deixando-se as tampas entreabertas. Junto as placas, dentro das cubas foram colocadas gases umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material.

- **Kerr Pulp Canal Sealer EWT (Extend Working Time):** por ser cimento do tipo pó/líquido, utilizou-se a proporção recomendada, em uma quantidade aproximada de 2,8 g de pó para 1 ml de líquido,⁴⁰ sendo que a mistura foi espatulada vigorosamente com uma espátula metálica nº 24 por toda a placa de vidro, triturando-se os cristais do pó, até atingirmos consistência clínica ideal e homogênea, ao ponto que ao levantar-se a espátula com cimento formava-se um fio com altura aproximada de 2 cm sem que houvesse o seu rompimento. A placa contendo o cimento já preparado foi armazenada por 48 horas em uma cuba metálica, deixando-se a tampa entreaberta. Junto a placa, dentro da cuba foram colocadas compressas de gazes umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material.
- **Tubli-Seal™:** por ser cimento do tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocados em partes iguais (6 cm) de pasta de base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro, e com auxílio de uma espátula metálica nº 24, incorporou-se um ao outro até obter-

se uma mistura homogênea. As placas contendo o cimento já preparado foram armazenadas por 48 horas em cubas metálicas, deixando-se as tampas entreabertas. Junto as placas, dentro das cubas foram colocadas gases umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material.

- **EndoREZ™**: por ser cimento do tipo pasta/pasta (base e catalisador), foram colocados em partes iguais (6 cm) de pasta de base e de pasta catalisadora sobre uma placa de vidro, e com auxílio de uma espátula metálica nº 24, incorporou-se um ao outro até obter-se uma mistura homogênea. As placas contendo o cimento já preparado foram armazenadas por 48 horas em cubas metálicas, deixando-se as tampas entreabertas. Junto as placas, dentro das cubas foram colocadas gases umedecidas com água destilada, mantendo a umidade relativa do ar e também como adjuvante na presa do material.

3. Obtenção das soluções dos cimentos em concentrações de 18mg/ml e 9mg/ml

As soluções dos cimentos em concentrações de 18 mg/ml e 9 mg/ml foram obtidas através da adição de polietileno glicol 400. As obtenções das soluções foram feitas após fracionamento e pulverização dos cimentos pós-presa, pesados numa balança de precisão (Metler AJ150, da Metler-Toledo AG, USA) em um sonicador (Sonic & Materials,

Vibra Cell[®]), e posteriormente diluídos em polietileno glicol 400 e esterilizados em autoclave por 20 minutos à 121°C.

4. Coleta, quantificação e preparo das células na reação do peróxido de hidrogênio - H₂O₂

▪ Coleta

Neste experimento camundongos foram utilizados como fonte para obtenção de macrófagos peritoneais. Na cavidade abdominal de cada animal foram introduzidos com seringa e agulha descartáveis esterilizadas, uma quantidade de 3,0 ml de solução Tioglicolato de Sódio** à 3% com período de antecedência de 72 horas à 96 horas para a estimulação/ativação dos macrófagos.

Após a injeção do Tioglicolato de Sódio à 3% os animais foram mantidos no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em gaiolas com ração balanceada e água "ad libitum". O sacrifício dos animais foi realizado 96 horas após estimulação/ativação dos macrófagos. Os animais foram colocados em um suporte onde ficaram imobilizados pelas patas com o abdômen voltado para cima. Feita a anti-sepsia do abdômen com álcool iodado a 0,3%, o peritônio dos camundongos foi exposto, realizando-se um corte com tesoura de ponta fina, aproximadamente de 2 cm, e depois a pele distendida suavemente, com auxílio de duas pinças. A seguir, com seringa e agulha descartáveis,

* Sonic & Materials Inc. Danbury, CT. USA

** Difco, da Difco Laboratories, USA

introduziu-se na cavidade abdominal do camundongo, 5,0 ml da solução tamponada de fosfatos de potássio a 19mM, pH 7,0, contendo NaCl 140 mμ e dextrose 5,5 mμ. Após a massagem digital o conteúdo foi sugado com auxílio da mesma seringa e agulha (Figura 1). Após remoção da agulha, o conteúdo foi despejado vagarosamente em um tubo de centrífuga de 15 ml*.

FIGURA 1 - Sucção do lavado peritoneal.

* Corning, da Corning Incorporated - USA

O lavado peritoneal de cada animal foi centrifugado* sob refrigeração a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante era então desprezado. Foi adicionado 1,0 ml da solução tampão fosfato, pH 7,0, fazendo-se uma nova homogeneização e centrifugação. Este procedimento foi repetido mais duas vezes para uma completa lavagem das células peritoneais. Da suspensão celular contendo 1,0 ml de solução salina foram retirados 10 μ l e adicionados 90 μ l de líquido de Lázarus em recipiente a parte e homogeneizado para a contagem celular. Dez μ l foram removidos e introduzidos na câmara de Neubauer (Boeco, da Boeco, Germany) para quantificação das células, sob microscópio óptico comum (Zeiss, modelo Jena) utilizando-se a objetiva de 40X de aumento.

A seguir, levando-se em consideração o número de células por ml, após a remoção da solução salina, as células foram resuspensas ao volume original em solução tamponada de fosfato de potássio, pH 7,0, contendo 140 m μ de NaCl, 5,5 m μ de dextrose, 9,56 m μ de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte, tipo II, 0,1 mg/ml Sigma**, para se obter a concentração desejada de células de 2,0 x 10⁶/ml.

▪ **Preparo das culturas e adição dos cimentos**

Foram utilizadas nesta fase placas para culturas de tecidos estéreis (Corning***), de 96 orifícios (96 Well) (Figura 2). Foram feitas leituras simultâneas de células provenientes de dois animais, em

* Hermle 2K380, da B. Hermle AG, Germany

** Sigma, St Louis, USA

*** Corning - New York 14931 - USA

cada teste experimental. Cada cimento foi experimentado nas respectivas concentrações, em quadruplicata. Alíquotas de 100 μ l contendo as células foram transferidas para placas de culturas de tecidos (Corning). Acrescentaram-se 50 μ l das soluções dos cimentos. No grupo controle positivo foi utilizado apenas a suspensão celular sem adição de cimentos endodônticos, utilizando o Zimosan (Sigma, 2-4250) na concentração de 5 m μ /ml em tampão fosfato como controle de reação.

FIGURA 2 - Placa de 96 orifícios.

▪ **Tempo de incubação**

As placas foram colocadas em incubadora a 37°C contendo uma tensão de 5,0% de CO₂ por 1 hora. Após a incubação, 50 μ l de NaOH 5 N foram adicionados para interrupção da reação.

▪ **Análise da absorbância**

Finalmente 100 μ l do sobrenadante foram removidos e realizada a leitura em leitor de ELISA (Figura 3) automático (GENETIC SYSTEMS* - microplate reader) com filtro 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 5 N. Os resultados foram expressos em micromoles à partir de uma curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações nanomoles para o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2).

FIGURA 3 - Leitor de Elisa.

* Genetic System - USA

5. Preparo e obtenção dos animais para a reação de Óxido Nítrico - NO

Nessa metodologia de dosagem de NO foram utilizados 11 camundongos Swiss, machos, de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Os animais durante os testes foram mantidos em gaiolas, recebendo ração balanceada e água "ad libitum".

Cada camundongo serviu de fonte de macrófagos peritoneais para cada cultura.

A morte dos animais era realizada separadamente, 1 por vez, para todos os experimentos, por asfixia respiratória, em cuba de vidro contendo no seu interior algodão embebido em éter sulfúrico.

▪ Coleta

Neste experimento foram repetidos os passos do experimento anterior. Na cavidade abdominal de cada animal foram injetados 3,0 ml de solução Tioglicolato de Sódio à 3% com período de antecedência de 72 horas à 96 horas para a estimulação/ativação dos macrófagos. As etapas seguintes foram realizadas em câmara de fluxo laminar*.

Após a injeção do Tioglicolato de Sódio à 3% os animais foram mantidos no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em gaiolas, com ração balanceada e água "ad libitum", por um período de 72 à 96 horas.

* Veco, da Veco, Campinas-SP, Indústria Brasileira

▪ **Preparo dos cimentos**

Os cimentos foram preparados conforme descrição do item 2.

▪ **Obtenção das soluções dos cimentos**

As soluções dos cimentos em concentrações de 18 mg/ml e 9 mg/ml foram obtidas através da adição de polietileno glicol 400. As obtenções das soluções foram feitas após fracionamento e pulverização dos cimentos pós-presa, pesados numa balança de precisão (Metler AJ150, da Metler-Toledo AG, USA) em um sonicador (Sonic & Materials, Vibra Cell*), e posteriormente diluídos em polietileno glicol 400 e esterilizados em autoclave por 20 minutos à 121°C.

▪ **Coleta, quantificação e preparo das células para reação**

Após o sacrifício, os animais foram colocados em um suporte onde ficaram imobilizados pelas patas com o abdômen voltado para cima. Feita a anti-sepsia do abdômen com álcool iodado a 0,3%, o peritônio dos camundongos foi exposto, realizando-se um corte com tesoura de ponta fina, aproximadamente de 2 cm, e depois a pele distendida suavemente, com auxílio de duas pinças. Com uma seringa e agulha descartáveis, estéreis, introduziu-se 5,0 ml na cavidade abdominal do animal de solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 (PBS). Após a massagem digital da cavidade abdominal, o conteúdo foi sugado com auxílio da mesma seringa e agulha. Após a remoção da agulha, o conteúdo foi despejado vagarosamente em um tubo de plástico estéril de centrífuga de 15 ml.

* Sonic & Materials Inc. Danbury, CT. USA

O lavado peritoneal de cada animal, foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Em câmara de fluxo laminar* (Figura 4) o sobrenadante foi desprezado e 3,0 ml de PBS foi adicionado às células e feita nova homogeneização e centrifugação, etapas que ainda foram repetidas por mais duas vezes.

FIGURA 4 - Profissional trabalhando em câmara de fluxo.

* Veco, da Veco, Campinas-SP, Indústria Brasileira

O sobrenadante foi desprezado e as células resuspensas em 1,0 ml de meio RPMI-1640 (Sigma), contendo 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma), 2 µm de L glutamina (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cutilab*). Foram removidos 10 µl da suspensão contendo as células e acrescentado 90 µl de líquido de Lázarus em recipiente a parte e homogeneizado. Removeu-se 10 µl e introduziu-se em uma câmara de Neubauer para a contagem das células, sendo que as concentrações obtidas em todos os camundongos foi deixada a $5,0 \times 10^6$ células/ml variando-se apenas o volume da suspensão, usando novamente o meio de RPMI-1640 (Sigma).

▪ **Preparo da cultura celular e adição dos cimentos**

Alíquotas de 100 µl da suspensão contendo as células foram colocadas em placa de cultura de tecido de 96 orifícios (96 Well) estéreis (Corning). Cada cimento foi experimentado em quadruplicata, adicionando-se alíquotas de 50 µl de cada concentração em estudo para a placa de cultura de tecidos contendo as células. No grupo controle positivo foi utilizado apenas a suspensão celular sem adição de cimentos endodônticos, utilizando uma quantidade de 100 µl ou 0,1 ml de uma solução à 10 mg/ml de lipopolissacarídeo (LPS) da E. coli 026:B6 (Difco) como controle.

* Cutilab Materiais para Cultura de Células Ltda., Campinas/SP

- **Tempo de incubação**

A incubação foi feita por 24 horas a 37°C contendo uma tensão de 5,0% de CO₂.

- **Análise da absorbância**

Na fase final 50 µl do sobrenadante das culturas celulares foram removidos e colocados em outra placa. Acrescentou-se 50 µl do reagente de Griess e após um repouso de 10 minutos à temperatura ambiente, foi feita a leitura em leitor de ELISA automático* com um filtro 540 nm.

Os resultados foram expressos em micromoles a partir de uma curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações micromoles conhecidas de NO.

FIGURA 5 - Leitor de ELISA.

* Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia

Resultado

Tabela 1 - Média e desvio padrão de liberação de Peróxido de Hidrogênio, em nanomoles/well, para diversos cimentos, o limite inferior (LI) e o limite superior (LS) do intervalo de 95% de confiança para a média (letras iguais na última coluna indicam que as médias correspondentes não diferem, no nível de 5% de significância)

CIMENTO		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	LI	LS	
Topseal	9 mg/ml	429,93	29,80	355,90	503,95	A
	18 mg/ml	716,00	57,39	573,44	858,56	B
EndoRez	9 mg/ml	153,34	5,41	139,90	166,78	C
	18 mg/ml	211,15	5,67	197,06	225,23	D
Tubli-Seal	9 mg/ml	0,00	0,00	-	-	
	18 mg/ml	75,91	7,50	57,28	94,55	E
Kerr Pulp E.W.T.	9 mg/ml	0,00	0,00	-	-	
	18 mg/ml	0,00	0,00	-	-	
Zimosan (controle)		270,39	37,28	177,78	363,00	D

Tabela 2 - Média e desvio padrão de liberação de Óxido Nítrico, em micromoles, para diversos cimentos, o limite inferior (LI) e o limite superior (LS) do intervalo de 95% de confiança para a média (letras iguais na última coluna indicam que as médias correspondentes não diferem, no nível de 5% de significância)

CIMENTO		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	LI	LS	
Topseal	9 mg/ml	4,38	0,70	2,64	6,12	A
	18 mg/ml	12,18	1,01	9,68	14,68	B
EndoRez	9 mg/ml	0,00	0,00	-	-	
	18 mg/ml	0,00	0,00	-	-	
Tubli-Seal	9 mg/ml	0,00	0,00	-	-	
	18 mg/ml	3,96	0,21	3,45	4,48	A
Kerr Pulp E.W.T.	9 mg/ml	1,90	0,07	1,73	2,07	C
	18 mg/ml	10,93	0,29	10,22	11,64	B
LPS (controle)		60,88	3,93	51,12	70,64	D

Tabela 3 - Valores de liberação de Peróxido de Hidrogênio, em nanomoles/well

CIMENTO		REPETIÇÃO		
		1	2	3
Topseal	9 mg/ml	463,47	419,80	406,51
	18 mg/ml	653,34	728,66	766,00
EndoRez	9 mg/ml	147,64	153,98	158,40
	18 mg/ml	204,61	214,10	214,73
Tubli-Seal	9 mg/ml	0,00	0,00	0,00
	18 mg/ml	67,26	79,92	80,56
Kerr Pulp E.W.T.	9 mg/ml	0,00	0,00	0,00
	18 mg/ml	0,00	0,00	0,00
Zimosan (controle)		303,33	277,92	229,92

Tabela 4 - Valores de liberação de Óxido Nítrico, em micromoles/well

CIMENTO		REPETIÇÃO		
		1	2	3
Topseal	9 mg/ml	3,64	4,47	5,03
	18 mg/ml	12,83	11,02	12,69
EndoRez	9 mg/ml	0,00	0,00	0,00
	18 mg/ml	0,00	0,00	0,00
Tubli-Seal	9 mg/ml	0,00	0,00	0,00
	18 mg/ml	3,92	3,78	4,19
Kerr Pulp E.W.T.	9 mg/ml	1,83	1,90	1,97
	18 mg/ml	11,02	10,61	11,16
LPS (controle)		65,33	59,40	57,90

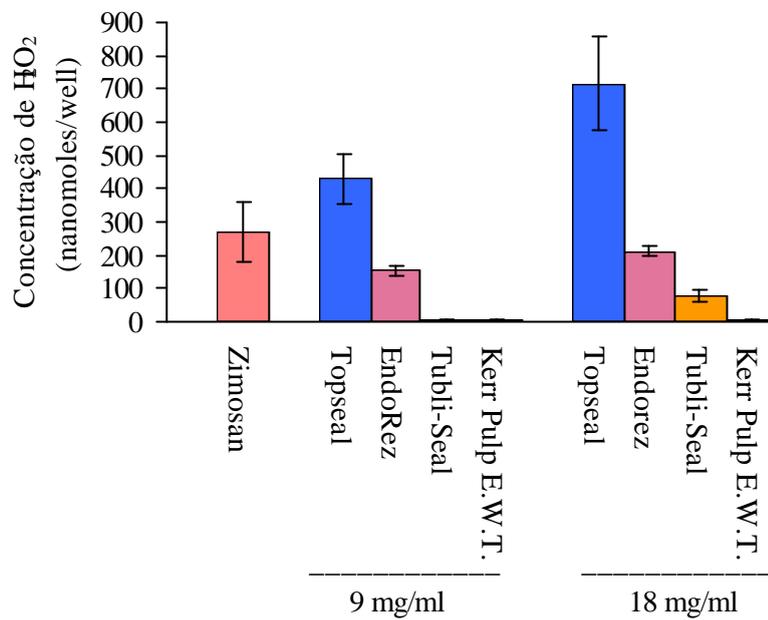


FIGURA 6 - Representação gráfica das médias de liberação de Peróxido de Hidrogênio e os respectivos intervalos de 95% para as médias.

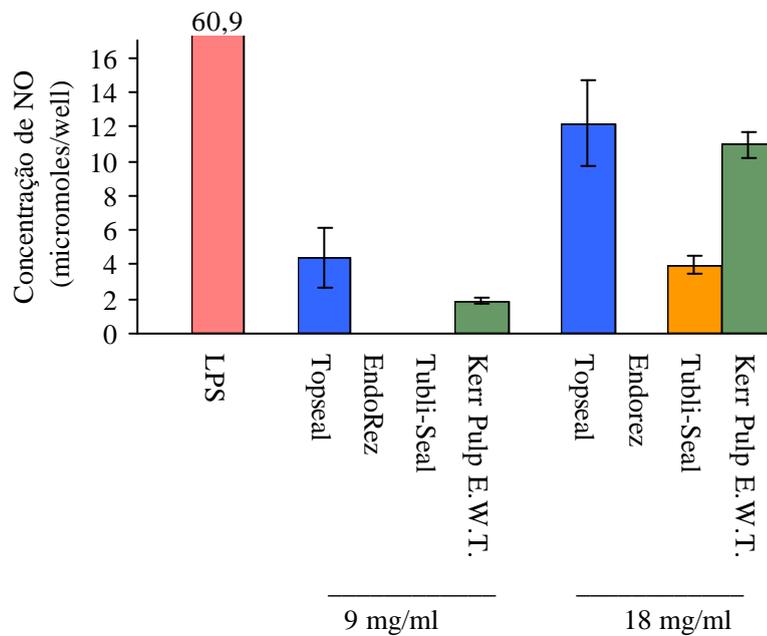


FIGURA 7 - Representação gráfica das médias de liberação de Óxido Nítrico e os respectivos intervalos de 95% para as médias.

Discussão

Da metodologia

Atualmente, apesar dos diferentes níveis de pesquisa utilizados em Endodontia, como por exemplo os testes primários (hematogênicos e de cultura celular), secundários (implantes em subcutâneo de ratos, camundongos) e tradicionais clínico/microscópicos (dentes de gatos, cães, macacos e humanos); maior importância é dada aos testes tradicionais.¹⁰³ A facilidade em se comparar os resultados microscópicos da região pulpar e periapical de dentes de cães e macacos, com os resultados clínicos em humanos, obscurece as análises centradas no entendimento de micro estruturas celulares e de seus componentes.⁶¹ No entanto, grandes são as objeções quanto ao uso desses animais (cães e macacos) devido o alto custo e restrições das sociedades protetoras de animais.^{32,63}

Para se avaliar a biocompatibilidade^{49,65,105} de materiais obturadores, basta permitir o contato desses materiais com o tecido conjuntivo apico/periapical. A partir do conhecimento dos fenômenos inflamatórios, infecciosos e de reparo, extrapola-se tais constatações para as observações clínicas, criando um modelo de estudo e avaliação.^{25,88,103}

Apesar do alto custo e das restrições, esse modelo é

bastante utilizado e já se consagrou, criando inclusive diferenciações para "status" de vitalidade pulpar e necrose pulpar com ou sem sugestão radiográfica de lesão periapical. Tal modelo, atinge tanta fidedignidade, que já é possível se criar modelos com específica microbiota.⁴³ A facilidade de reprodutibilidade, no entanto, tem levado a maioria dos pesquisadores a realizarem controle de qualidade de diferentes materiais e técnicas, ao invés de criar novos materiais e aprimoramento dos já existentes.^{37,43,86}

É comum a análise comparativa de diferentes materiais obturadores utilizando esse nível de pesquisa.^{2,10,47} Como a indústria dificilmente divulga com precisão a composição de tais materiais, o pesquisador deixa de lado seu âmagio investigativo e passa a comparar distintos materiais, elegendo aquele que melhor se comporta na região periapical e apical decorrido certo período de tempo.^{67,74}

Metaforicamente, se um desses pesquisadores/controladores de qualidade fosse um engenheiro civil, primeiro construir-se-ia uma ponte e verificar-se-ia qual a tonelagem máxima que um caminhão poderia utilizar para atravessá-la. Após a passagem de um caminhão com 10 toneladas, experimentar-se-ia o próximo com 11 toneladas, 12 toneladas e assim por diante, até que a ponte fosse danificada, e aí sim estipular-se-ia a máxima tonelagem permitida. Assim é feito o controle de qualidade que verifica qual material é mais biocompatível^{49,65,105} que outro, a partir de metodologia pré-estabelecida.

Quando começou a restrição ao uso de animais (cães e macacos)^{26,32,63} para investigação em odontologia nos anos 90s,^{20,26} passou-se a atentar para níveis menos complexos de avaliação, com maior controle sobre os fatores experimentais e menor número de variáveis. Constatou-se como é difícil ser simples, e a partir da análise de um grupo celular, extrapolar e somar resultados para o melhor entendimento da biocompatibilidade, e principalmente de um subconjunto dessa, a citotoxicidade.^{3,5,7,8,11,79} Nesse nível de pesquisa (cultura de células) os primeiros elementos a serem avaliados utilizavam-se culturas de células HeLa⁷³ e as conseqüentes absorções de Cr⁵¹, alterações morfológicas, seguindo o conceito de tumefação turva, condensação cromatínica, cariorrexe e cariólise, proliferação e interrupção do processo mitótico.^{7,84} Seguindo o conceito de análise e conhecimento dos processos de agressão celular,¹⁸ iniciou-se a interpretação de como alguns materiais odontológicos se comportaram em relação ao contato direto e/ou indireto com as culturas de células HeLa.^{88,89} É importante ressaltar as evoluções obtidas neste contexto, a partir das realizações de Spangberg et al.,⁸⁹ principalmente sobre como se estocar, cultivar e manter vivas essas células, os meios para a sobrevivência e principalmente, a não interação negativa com as células, estressando-as. As células HeLa porém apresentavam alguns inconvenientes do ponto de vista fidedignidade ou proximidade da situação celular real e de normalidade. Tais células são provenientes de tumor maligno, onde as

células têm a tendência natural de se multiplicar, e assumir uma morfologia próxima do estágio embrionário.¹⁸ Esse "status quo", não é o mesmo da fisiologia normal da região apical e periapical; apesar disso, a partir da análise das reações já mencionadas, desse grupo celular, iniciou-se o entendimento da complexidade das reações aí presentes.⁵¹

Aprimorando-se esse modelo, iniciou-se na década de 90, o uso de fibroblastos da região subcutânea, conjuntiva de ratos e camundongos e pulpar de cães e humanos.^{1,4,5,49} Logicamente, esse modelo é muito mais fidedigno que o das células HeLa. Dentre as populações residentes no tecido conjuntivo apico/periapical, destaca-se o grupo celular fibroblástico.^{34,56}

O contato de materiais obturadores (corpos estranhos)⁷⁶ com esse grupo celular promove a alteração morfológica, mudança no metabolismo, com variação para mais ou para menos na síntese colagênica, citodiferenciação, ativação mitótica, apoptose acelerada ou retardada e liberação de citocinas e/ou fatores de crescimento e/ou citodiferenciação.⁴⁹ Esse modelo, muito mais complexo, permitiu analisar vários parâmetros diferentes de comportamento, e a partir daí possibilitar interpretações que coadjuvadas da análise das células HeLa, permitiram um melhor entendimento e compreensão do que é citotoxicidade^{3,5,7,8,11,65} e conseqüentemente biocompatibilidade.^{49,65} Esses estudos, nesse nível de pesquisa, serviram como um "turning point", no modelo a ser utilizado para analisar o comportamento biológico dos materiais obturadores.⁸⁹

Esse modelo, já no fim dos anos 90s, passou a predominar^{20,72} por ser mais barato, de fácil obtenção, rápido e utilizando animais inferiores (ratos e camundongos) e trazendo informações compatíveis com comportamento biológico. Basicamente, o que houve foi uma mudança radical na concepção do que é pesquisa em Endodontia. Lembrando a metáfora da ponte, o pesquisador agora, sendo um engenheiro civil, primeiro faz os cálculos de cada setor da ponte, de cada estrutura, e quando a constrói, já sabe de antemão, qual a tonelagem máxima que a própria suporta. É portanto uma inversão no conceito investigativo. Ao invés de se pensar macroscopicamente, ou quando muito analisando microscopicamente um tecido; o que agora ocorre é uma introspecção no âmago do tecido, diferenciando grupos celulares, as reações que cada grupo efetua, a relação e inter-relação entre esses grupos e suas implicações no processo infeccioso, inflamatório e de reparo.^{18,20,79}

Nesse estudo, avaliou-se o comportamento biológico a partir do contato do material obturador com células inflamatórias mononucleares.^{4,8,9,16,20}

Após a obturação do canal radicular, ocorre o contato do material obturador, com o tecido conjuntivo apical. Em se tratando de um dente que apresenta vitalidade pulpar, esse tecido conjuntivo está normalmente isento de infecção, e com inflamação de suave a moderada, devido as alterações pulpares. Predomina aí fibroblastos e células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares.¹⁸ Após os passos

operatórios próprios dessa terapia e obturando-se o canal radicular, após alguns dias a perpetuação desse contato, dependerá das condições intrínsecas do material e das reações provenientes deste contato. A célula que coordena essas reações, que funciona como um maestro coordenando as ações da orquestra (ou seja de todo o tecido, reação de Schwartzman), é o macrófago.^{18,76}

Quando se obtura o canal radicular de um dente que apresenta necrose/gangrena pulpar, geralmente o tecido que está presente no periápice tem predominância de células polimorfonucleares com poucas mononucleados, nos processos agudos, e predominância de tecido granulomatoso nos processos crônicos.¹⁸

Em ambas as situações, após a obturação, ocorre a mudança no "status quo" desses tecidos inflamados aguda ou cronicamente, para tecido de granulação, onde predominam os macrófagos, que aí também regem o processo de reparo.⁴⁹ É portanto, o macrófago, a célula de maior importância no entendimento das reações que ocorrem pós-obturação.¹⁰⁷ O material obturador, substitui de maneira an mala, a realidade do tecido pulpar. É para o organismo um corpo estranho. O reconhecimento dessa "estranheza"   feito pelo complexo maior de histocompatibilidade, presente nos linfócitos T e macrófagos.⁷⁶ A partir desse reconhecimento, o macrófago inicia a fagocitose ou tentativa de fagocitose desse corpo estranho.^{18,76}

Dependendo das características intr secas de cada

material obturador, durante a fagocitose ocorre a "liberação" de citocinas como por exemplo, Interleucinas e fatores de crescimento^{53,65} que ao interagirem com os fibroblastos induzindo a citodiferenciação e alteração metabólica que levam a produção de matriz mineralizadora ou fibras colágenas^{72,83} que terminam isolando o material obturador do tecido conjuntivo, impedindo o contato com macrófagos e conseqüente reação corpo estranho/conjuntivo.^{49,70}

Esse isolamento permite a perpetuação desse material ao nível foraminal, conferindo biocompatibilidade.^{49,65,105}

Também do contato material/macrófago, através da estimulação da membrana celular do macrófago, ocorre a oxidação do substrato celular com produção de superóxido O_2^- e peróxido de hidrogênio. Tanto o O_2^- quanto o H_2O_2 são provenientes da "explosão oxidativa mitocondrial",^{68,69,72} no metabolismo dessa células para obtenção de energia. Quanto mais citotóxico o material, mais energia o macrófago necessita para fagocitá-lo.^{49,68,69,72} Assim para maior obtenção de energia, maior a oxidação de substrato e conseqüente liberação de superóxidos e peróxido de hidrogênio. A partir dessa premissa desenvolvida por Pick & Keisari⁶⁸ e Pick & Mizel,⁶⁹ do começo dos anos 80s utilizando como substrato o vermelho fenol e a enzima peroxidase de raiz forte, através de um método colorimétrico, passamos a utilizar tal metodologia para avaliar a citotoxicidade de diferentes materiais obturadores e seus respectivos componentes. Além de parâmetro para

análise de citotoxicidade,^{68,69} o O_2^- e H_2O_2 desempenham papel fundamental na atividade bactericida, principalmente atuando em anaeróbios estritos Gram negativos.¹⁸ O óxido nítrico (NO) é outro radical livre que apresenta importante papel na patologia e fisiologia humana. Ele é formado a partir do aminoácido L-arginina. A conversão de L-arginina para o NO é específica, considerando que análogos da L-arginina, incluindo seu enantiômero com configuração D, não funciona como substrato.⁶⁴

O óxido nítrico tem íntima relação com o processo inflamatório e sua magnitude,^{59,64,94} O processo inflamatório é um fenômeno basicamente vascular.¹⁸ Quanto maior a vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, maior a quantidade de células inflamatórias e derivados que perpetuam a inflamação, presente no tecido conjuntivo.^{18,36,59}

O NO intermedeia as reações de relaxamento e constricção vascular.⁶⁴ Liberado em grandes quantidades potencializa o processo inflamatório.⁹⁴ Além da ação relaxante vascular, o NO inibe a agregação plaquetária e é citoprotetor, sendo liberado por macrófagos como parte do metabolismo antimicrobiano, juntamente com O_2^- e H_2O_2 .^{59,64}

Na reação inflamatória aguda, a interação NO/prostaglandina é inibida com a diminuição do teor de NO, reduzindo o acúmulo de leucócitos e edema.⁹⁴ Assim como o H_2O_2 , os níveis de NO

podem ser determinados através de análise colorimétrica (Reação de Griess),^{24,59,68,69} e aumentam também, de acordo com o aumento da citotoxicidade,^{59,72} portanto este mediador é utilizado também como parâmetro para a avaliação de citotoxicidade auxiliando na compreensão da biocompatibilidade material/tecido hospedeiro.^{65,105}

Da estatística

Na Tabela 1 são apresentadas as médias de liberação de Peróxido de Hidrogênio, em nanomoles/well, para o estudo da citotoxicidade dos quatro cimentos obturadores, em duas concentrações (9 mg/ml e 18mg/ml): Topseal, EndoRez, Tubli-Seal e Kerr Pulp Canal Sealer E.W.T., além da média do Zimosan, controle positivo para o Peróxido de Hidrogênio. Nesta tabela estão expostos também, para cada cimento e para o controle, o desvio padrão e os limites superior e inferior do intervalo de 95% de confiança para a média, nos casos em que ocorreu liberação diferente de zero.

Os intervalos de confiança permitem uma avaliação estatística do efeito dos cimentos sobre a liberação de Peróxido de Hidrogênio. Quase todos os intervalos são disjuntos, de forma que as médias de liberação, nestes casos, são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Há dúvida somente se a média do controle difere da média de liberação de H_2O_2 do cimento EndoRez na concentração 18 mg/ml. Então,

as médias foram comparadas duas a duas pelo teste t de "Student", levando-se em consideração se os desvios padrão são diferentes. A significância obtida está indicada na última coluna da Tabela 1, onde letras diferentes indicam que as médias correspondentes são diferentes a um nível de significância menor do que 5% ($p < 0,05$).

Na Tabela 2 são apresentados as médias, desvios padrão e limites dos intervalos de 95% de confiança relativos à liberação de Óxido Nítrico, em micromoles/well, para o estudo da citotoxicidade dos quatro cimentos obturadores, nas concentrações de 9 mg/ml e 18mg/ml. Neste caso o LPS é o controle positivo.

Assim, quanto à liberação de Óxido Nítrico, nem sempre os intervalos de confiança foram disjuntos e, para alguns cimentos, não houve evidência estatística de diferença significativa entre as médias. Entretanto, a média de liberação do LPS é muito maior do que as médias de liberações de NO dos quatro cimentos, em qualquer uma das duas concentrações. A média de liberação do LPS foi cerca de 5 vezes maior do que a maior média de liberação dos cimentos em estudo. Então, como método aproximado, as médias foram comparadas duas a duas pelo teste t de "Student", confirmando os resultados que se obtém através dos intervalos de confiança. Na última coluna da Tabela 2, letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias correspondentes, quando essas são maiores do que zero ($p < 0,05$).

Pode-se resumir os resultados de liberação média, do ponto de vista estatístico, da seguinte forma:

a) Liberação média de Peróxido de Hidrogênio

Concentração 9 mg/ml:

Kerr Pulp E.W.T. = Tubli-Seal < EndoRez < Zimosan < Topseal

Concentração 18 mg/ml:

Kerr Pulp E.W.T. < Tubli-Seal < EndoRez = Zimosan < Topseal

b) Liberação média de Óxido Nítrico

Concentração 9 mg/ml:

EndoRez = Tubli-Seal < Kerr Pulp E.W.T. < Topseal < LPS

Concentração 18 mg/ml:

EndoRez < Tubli-Seal < Kerr Pulp E.W.T. = Topseal < LPS

Esses resultados, tanto para o Peróxido de Hidrogênio como para o Óxido Nítrico, podem ser visualizados respectivamente nas Figuras 6 e 7. Nessas figuras as colunas representam as médias e os traços verticais representam os intervalos de 95% de confiança para a média. Para o Peróxido de Hidrogênio (Figura 6), com exceção relativamente ao cimento EndoRez (18 mg/ml) e o controle, os intervalos estão separados, tanto de um cimento para outro como em relação a um

mesmo cimento, indicando que a liberação é maior na concentração 18 mg/ml do que na concentração 9 mg/ml. Em relação ao Óxido Nítrico (Figura 7) a liberação é sempre maior para a concentração 18 mg/ml, exceto quando a liberação média dos dois cimentos é nula.

Dos resultados

Dos cimentos utilizados pela metodologia proposta, quanto à avaliação de citotoxicidade, o cimento EndoRez é inédito na literatura, sendo que os resultados aqui obtidos representam os primeiros relatos para sua avaliação, não tendo portanto, parâmetros para comparação na bibliografia específica. Quando se avalia a citotoxicidade, é comum extrapolar-se os resultados das observações para outros níveis de pesquisa e considerar-se biocompatibilidade. Não se deve esquecer que a citotoxicidade^{49,65} é um subconjunto da biocompatibilidade,¹⁰⁵ e somente coadjuvado de outros parâmetros, pode se extrapolar os resultados. Não é necessário portanto que um material para ser biocompatível não possa ser citotóxico. Mesmo na avaliação da citotoxicidade, seja ela por análise da liberação de NO, H₂O₂, IL-1, TNF α , TNF β , não há necessidade da existência de proporcionalidade entre essas liberações. Quando um material libera muito H₂O₂, por exemplo, o Topseal,⁷² indica que a fagocitose desse material requer grande

quantidade de energia. Essa alta citotoxicidade avaliada pela liberação de H_2O_2 pode ser acompanhada por índices menores de liberação de NO. Assim constatamos de acordo com os resultados obtidos, que em ambas as concentrações 9 mg/ml e 18 mg/ml, o cimento Topseal foi o que mais liberou H_2O_2 , indicando que no contato material/célula, esse cimento é mais citotóxico que o EndoRez, o Tubli-Seal e o Kerr Pulp Canal Sealer E.W.T. respectivamente.

Torna-se evidente que os dois cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (Kerr Pulp Canal Sealer E.W.T. e Tubli-Seal) foram menos citotóxicos que os dois cimentos resinosos (EndoRez, Topseal). É importante salientar que todos os cimentos foram solubilizados para permitir a fagocitose pelo macrófago. Essa condição geralmente se equipara aos cimentos antes de tomarem presa, e representa os períodos iniciais de avaliação nos níveis mais elevados de pesquisa.

O aumento de NO, que também indica exacerbação do processo inflamatório, através do aumento da permeabilidade vascular, também apresenta o cimento Topseal como mais agressivo para a concentração de 9 mg/ml e para 18 mg/ml ocorre empate de liberação com o Kerr Pulp Canal Sealer E.W.T., portanto ambos são mais citotóxicos que os demais cimentos experimentados, Tubli-Seal e EndoRez, respectivamente.

Comparando com outros níveis de pesquisa, estes

resultados são contraditórios,^{46,47,58,74,84,85} mas não se deve esquecer que não se deve coadunar diferentes níveis de pesquisa para se avaliar citotoxicidade. Assim, como não existe literatura correlata para esta metodologia, não comparamos os resultados de outros níveis de pesquisa.

A variável solubilidade, neste parâmetro avaliado, não tem correspondência à base do cimento, uma vez que o EndoRez apresentou os melhores resultados e o Topseal⁸⁷ os piores. Tal fato deve ocorrer devido a elementos inerentes a cada material, indicando que a análise separada de cada elemento que constitui esses materiais deva ser efetuada, servindo inclusive para o desenvolvimento de futuros trabalhos de pesquisas. Apesar dessas diferenças entre os cimentos, todos foram muito menos citotóxicos que o L.P.S., quanto a produção de NO, que foi utilizado como controle positivo na reação. E a metodologia usada neste trabalho, utilizou os cimentos após-presas, só então foram solubilizados, podendo tal processo permitir que o eugenol livre permaneça em pequenas quantidades,^{28,58} fato comprovado pelos resultados observados para os cimentos Kerr Pulp Canal Sealer E.W.T. e Tubli-Seal.

Se compararmos materiais conhecidamente fagocitáveis, a utilização de cimentos solubilizados após presa torna-se um requisito para às células exercerem esse processo fagocítico. No entanto, deve-se

adotar critérios antes de partirmos para testes de biocompatibilidade com elementos solubilizados, como a padronização do tempo após presa dos cimentos e do tempo de solubilização no uso do sonicador.

A extrapolação dos resultados para situações clínicas deve considerar limitações inerentes ao tipo de animal, o modelo experimental e as intercorrências naturais durante um tratamento endodôntico em humanos. Porém, as respostas dos macrófagos humanos dificilmente serão diferentes das observadas nos macrófagos derivados dos camundongos.^{6,20,49}

Conclusão

A liberação de H_2O_2 e NO frente aos diferentes cimentos apresentou as seguintes quantificações respectivamente:

a. Liberação média de Peróxido de Hidrogênio

Concentração de 9 mg/ml:

Kerr Pulp E.W.T. = Tubli-Seal < EndoRez < Zimosan < Topseal

Concentração de 18 mg/ml:

Kerr Pulp E.W.T. < Tubli-Seal < EndoRez = Zimosan < Topseal

b. Liberação média de Óxido Nítrico

Concentração de 9 mg/ml:

EndoRez = Tubli-Seal < Kerr Pulp E.W.T. < Topseal < LPS

Concentração de 18 mg/ml:

EndoRez < Tubli-Seal < Kerr Pulp E.W.T. = Topseal < LPS

Tais constatações nos levam a concluir que:

- Quanto a liberação de H_2O_2 , o cimento na ordem decrescente do mais citotóxico para o menos, e na concentração de 9 mg/ml temos: o Topseal > Zimosan > EndoRez > Tubli-Seal = Kerr Pulp E.W.T. e na concentração de 18 mg/ml: o Topseal > Zimosan = EndoRez > Tubli-Seal > Kerr Pulp E.W.T.
- Com relação ao NO, o cimento na ordem decrescente do mais citotóxico para o menos, e na concentração de 9 mg/ml temos: o LPS > Topseal > Kerr Pulp E.W.T. > Tubli-Seal = EndoRez e na concentração de 18 mg/ml: o LPS > Topseal = Kerr Pulp E.W.T. > Tubli-Seal > EndoRez.
- As duas metodologias se mostraram viáveis quanto à avaliação da citotoxicidade, tendo como parâmetros a liberação de H_2O_2 e NO, de materiais obturadores endodônticos solubilizados.

Referências bibliográficas *

- 1 AL-NAZHAN, S., SPANGBERG, L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *J. Endod.*, v.16, p.129-34, 1990.
- 2 ALMEIDA, W.A. *Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães, após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical.* Araraquara, 1997. 192p. Tese (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 3 ARAKI, K., SUDA, H., BARBOSA, S.V., SPANGBERG, L.S.W. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J. Endod.*, v.10, p.554-7, 1993.
- 4 ARENHOLT-BINDSLEV, D., BLEEG, H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *Int. Endod. J.*, v.23, p.84-91, 1990.
- 5 ARENHOLT-BINDSLEV, D., HORSTED-BINDSLEV, P. A simple

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas, Editora UNESP. *Normas para publicações da UNESP.* São Paulo: Editora UNESP, 1994. 4v., v.2. Referências bibliográficas.

- model for evaluation relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.5, p.219-26, 1989.
- 6 AZAR, N.G., HEIDARI, M., BAHRAMI, Z.S., SHOKRI, F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J. Endod.*, v.26, p.462-5, 2000.
- 7 BARBOSA, S.V., ARAKI, K., SPANGBERG, L.S. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.75, p.357-61, 1993.
- 8 BELTES, P., KOULAOUZIDOU, E., KOTOULA, V., KORTSARIS, A.H. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.11, p.245-9, 1995.
- 9 BIGGS, J.T., KAMINSKI, E.J., OSETEK, E.M. Rat macrophage response to implanted sealer cements. *J. Endod.*, v.11, n.1., p.30-6, 1985.
- 10 BILGINER, S., TIMURESENER, I., SÖYLEMEZOGLU, F., TIFTIK, A.M. The investigation of biocompatibility and apical microleakage of tricalcium phosphate based root canal sealers. *J. Endod.*, v.23, p.105-9, 1997.
- 11 BONETTI FILHO, I. *Avaliação da capacidade seladora de diferentes*

técnicas de obturação dos canais radiculares através da infiltração do corante Rodamina B à 0,2%. Araraquara, 1986. 67p. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

- 12 BONETTI FILHO, I. *Avaliação da biocompatibilidade de quatro técnicas de obturação de canais radiculares. Estudo em dentes de cães. Araraquara, 1990. 110 p. Tese (Doutorado em Dentística Restauradora) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.*
- 13 BRISEÑO, B.M., WILLERSHAUSEN, B. Root canal sealer cytotoxicity whit human gengival fibroblasts. III. Calcium hidroxide based sealer. *J. Endod.*, v.18, p.110-3, 1992.
- 14 BUTANK-KOBLER, D. et al. Cytotoxicity of Ca (OH)₂ endodontic sealers on connective, muscle and bone tissues. *Acta Stomatol. Croat.*, v.27, p.175-80, 1993.
- 15 CAMARGO, W.R. *Interação dos cimentos Sealapex e CRCS com os macrófagos - estudo morfológico dos efeitos citotóxicos. Bauru, 1993. 96 p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.*
- 16 CATANZARO-GUIMARÃES, S.A., PERCINOTO, C. Effect of some

endodontic material on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. *J. Endod.*, v.10, p.101-4, 1984.

17 COHEN, B.I., PAGNILLO, K.M., MUSIKANT, L.B., DEUSTCH, S.A. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J. Endod.*, v.26, p.228-9, 2000.

18 COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Inflamação e reparação. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. *Patologia estrutural e funcional*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap.3, p.45-83.

19 CRANE, D.L., HEUER, A.M., KAMINSKI, J.E., MOSER, B.J. Biological and physical properties of an experimental root canal sealer without eugenol. *J. Endod.*, v.6, p.438-45, 1980.

20 EGEA, S.J.J., RUBIO-MANZANARES, A.J. Los macrófagos peritoneales de rata como modelo celular in vitro para el estudio de la biocompatibilidad de los materiales odontológicos. *Operatoria Dental y Endodoncia*, v.2, n.1, p.1-6, 1998.

21 ERIKSEN, H.M., ØRSTAVIK, D., KEREKES, J. Healing of apical

- periodontitis after endodontic treatment using three root canal sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.4, p.114-7, 1988.
- 22 ERSEV, H., SCHMALZ, G., BAYIRLI, G., SCHWEIKL, H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cell in vitro. *J. Endod.*, v.25, p.359-63, 1999.
- 23 FEIGLIN, B. Effect of some endodontic sealers on cell migration in experimental granulomas. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.63, p.371-4, 1987.
- 24 FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Brasil*, v.46, p.265-71, 2000.
- 25 FOREMAN, P.C., BARNES, I.E. A review of calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, v.23, p.283-97, 1990.
- 26 GARCÉS-ORTIZ, M., LEDESMA-MONTES, C. Cytotoxicity of Ketac Silver cement. *J. Endod.*, v.23, p.371-3, 1997.
- 27 GEROSA, R., MENEGAZZI, G., BORIN, M., CAVALLERI, G.

- Cytotoxicity evaluation of six root canal sealers. *J. Endod.*, v.21, p.446-8, 1995.
- 28 GEROSA, R., BORIN, M., MENEGAZZI, G., PUTTINI, M., CAVALLEZI, G. In vitro evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. *J. Endod.*, v.22, p.532-4, 1996.
- 29 GUIGAND, M., PELLEN-MUSSI, P., GOFF, A.L., VULCAIN, J.M., BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J. Endod.*, v.25, p.419-23, 1999.
- 30 GULATI, N., CHANDRAS, S., AGGARWAL, P.K., JAISWAL, J.M., SINGH, M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.7, p.181-5, 1991.
- 31 HAN, G.Y., PARK, S.H., YOON, T.C. Antimicrobial activity of Ca(OH)_2 containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. *J. Endod.*, v.27, p.328-32, 2001.
- 32 HONG, Y.C., WANG, J.T., HONG, C.Y. The periapical tissue reactions to a calcium phosphate cement in the teeth of monkeys. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.25, p.485-98, 1991.
- 33 IALENT, A., IANARO, A., MONCADA, S., DI ROSA, M. Modulation of

- acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, v.211, p.177-82, 1992.
- 34 JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 482p.
- 35 KAWAKAMI, T., NAKAMURA, C., HASEGAWA, H., AKAHANE, S., EDA, S. Ultrastructural study of initial calcification in the rat subcutaneous tissues elicited by a root canal filling material. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.63, p.360-5, 1987.
- 36 KIM, S.K., KARABUCAK, B., WELSCH, H., SIMCHON, S., KIM, S. Intracellular mechanism of substance P-induced vasodilatation in bovine dental pulps. *J. Endod.*, v.27, p.231, 2001. (Abstract).
- 37 KOLOKOURIS, I., ECONOMIDES, N., BELTES, B., VLEMMAS, I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted in to the subcutaneous connective tissue of rats. *J. Endod.*, v.24, p.82-5, 1998.
- 38 KONTAKIOTIS, E., NAKAU, M., GEORGOPOULOU, M. *In vitro* study if the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int. Endod. J.*, v.28, p.285-9, 1995.
- 39 KOULAOUZIDOU, E.A., PAPAISIS, K.T., BELTES, P.,

- GEROMICHALOS, G.D., KORTSARIS, A.H. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.14, p.182-5, 1998.
- 40 LEAL, J.M. *Estudo sobre a infiltração e o comportamento dimensional de materiais para obturação de canais radiculares, em função da variação da proporção pó-líquido e do tempo de armazenagem dos corpos-de-prova.* Araraquara, 1966. 62p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara.
- 41 LEAL, J.M., HOLLAND, R., ESBERARD, R.M. Sealapex, CRCS, Fill Canal e N-Rickert. Estudo da biocompatibilidade em tecido conjuntivo do rato. *Odontol. Clín.*, v.2, n.1, p.7-14, 1988.
- 42 LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. Fases do tratamento do sistema de canais radiculares. In: ____ . *Endodontia: tratamento de canais radiculares.* 3.ed. São Paulo: Ed. Médica Panamericana, 1998. cap.11, p.253-9.
- 43 LEONARDO, M.R., SILVA, L.A., ALMEIDA, W.A., UTRILLA, L.S. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.15, n.1, p.28-32, 1999.
- 44 LEONARDO, M.R., SILVA, R.S., BEZERRA, L.S., ASSED, S.

Determinação de íons de Ca^{+2} , pH e solubilidade de pastas à base de hidróxido de cálcio contendo PMC e PMCC. *Rev. Bras. Odontol.*, v.50, n.1, p.5-10, 1993.

- 45 LEONARDO, M.R., SILVA, L.A.B., TANOMARU FILHO, M., SILVA, R.S. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.88, p.221-5, 1999.
- 46 LEONARDO, M.R., SILVA, L.A.B., LEONARDO, R.T., UTRILLA, L.S., ASSED, S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J. Endod.*, v.19, p.348-52, 1999.
- 47 LEONARDO, M.R., SILVA, L.A., UTRILLA, L.S., ASSED, S., ETHER, S.S. Calcium hydroxide root canal sealers-histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J. Endod.*, v.23, p.428-32, 1997.
- 48 LEONARDO, R.T. *Avaliação microscópica da reação apical e periapical frente a dois cimentos obturadores de canais radiculares à base de hidróxido de cálcio (CRCS e Sealapex) em dentes de cães.* Bauru, 1992. 108 p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 49 LEONARDO, R.T. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos*

endodônticos, quanto à alteração morfológica e a liberação de peróxido de hidrogênio, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. Bauru, 1997. 158 p. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

- 50 LEONARDO, R.T., CONSOLARO, A., CARLOS, I.Z., LEONARDO, M.R. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J. Endod.*, v.26, p.328-30, 2000.
- 51 MASEKI, T., YASUMURA, K., NANBA, I., KOBAYASHI, E., NAKAMURA, H. Alterations in macrophages after exposure to root canal filling materials. *J. Endod.*, v.22, p.450-4, 1996.
- 52 MATSUMOTO, K., INOUE, K., MATSUMOTO, A. The effect of newly development root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J. Endod.*, v.15, p.60-7, 1989.
- 53 MERYON, S.D., BROOK, A.M. In vitro comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *Int. Endod. J.*, v.23, p.203-10, 1990.
- 54 METZGER, Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.16, n.1, p.1-8, 2000.
- 55 MITAL, M., CHANDRA, S., CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity

- evaluation of four endodontic sealers. *J. Endod.*, v.21, p.622-4, 1995.
- 56 MJÖR, I.A, PINDBORG, J.J. (Eds.) *Histology of the human tooth*. Copenhagen: Munksgaard, 1973. 180p.
- 57 MOLLOY, D., SOLDMAN, M., WHITE, R.R., KABANI, S. Comparative tissue tolerance of s new endodontic sealer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.73, p.490-3, 1992.
- 58 MOLNAR, E.J. Residual eugenol from zinc oxyde-eugenol compounds. *J. Dent. Res.*, v.46, p.645-9, 1967.
- 59 MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p.109-42, 1991.
- 60 MORSE, D.R., MARTELL, B., PIKE, C., FANTASIA, J., ESPOSITO, J., FURST, L. A comparative tissue toxicity evaluation of gutta-percha root canal sealers. Part I. Six-hour findings. *J. Endod.*, v.10, p.246-9, 1984.
- 61 NORRIS, K.A., SCHRIMPF, E.J., FLYNN, L.J. JR, S.M. Enhancement

of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.*, v.63, p.2793-6, 1995.

62 OLSSON, B., SLIWKOWSKI, A., LANGELAND, K.O. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J. Endod.*, v.7, p.355-69, 1981.

63 ORBAN, B. The problem of root canal treatment. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.19, p.1384-8, 1932.

64 PALMER, R.M.J., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived, relaxing factor. *Nature*, v.327, p.524-6, 1987.

65 PERASSI, F.T. *Liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos na presença de cimentos endodônticos*. Araraquara, 2000, 141p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

66 PERTOT, W-J, CAMPS, J., REMUSAT, M., PROUST, J.P. "In vivo"

comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.73, p.613-20, 1992.

67 PERTOT, W.J., STEPHAN, G., TARDIEU, C., PROUST, J.P. Comparison of the intraosseous biocompatibility of DYRACT and SUPER EBA. *J. Endod.*, v.23, p.315-9, 1997.

68 PICK, E., KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.*, v.38, p.161-70, 1980.

69 PICK, E., MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, v.46, p.211-26, 1981.

70 PISSIOTIS, E., SPANGBERG, L.S. Biological evaluation of collagen gels containing calcium hydroxide and hydroxyapatite. *J. Endod.*, v.16, p.468-73, 1990.

71 PISSIOTIS, E., SPANGBERG, L.S.W. Toxicity of pulpispad using four different cell types. *Int. Endod. J.*, v.24, p.249-57, 1991.

72 QUEIROZ, C.E.S. *Avaliação da citotoxicidade de cimentos*

endodônticos quanto à liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos. Araraquara, 1997. 133p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

73 RAPPAPORT, H.M., LILLY, G.E., KAPSIMALIS, P. Toxicity of endodontic filling material. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.18, p.785-802, 1964.

74 RASQUIN, L.C. *Avaliação histopatológica da reparação apical e periapical em dente de cães portadores de lesão periapical crônica, experimentalmente induzida, após tratamento de canais radiculares e obturação com 3 cimentos à base de hidróxido de cálcio.* Araraquara, 1997. 174 p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

75 RASQUIN, O.M. *Citotoxicidade de cimentos endodônticos frente a macrófagos.* Rio de Janeiro, 2000. 127p. Tese (Livre-Docência em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Gama Filho.

76 ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Imunologia.* 5.ed. São Paulo:

Ed. Manole, 1999. 423p.

- 77 SAFAVI, K.E., NICHOLS, F.C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J. Endod.*, v.19, p.76-8, 1993.
- 78 SAFAVI, K.E., PASCON, E.A., LANGELAND, K. Evaluation of tissue reaction to endodontic materials. *J. Endod.*, v.9, p.421-9, 1983.
- 79 SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. *J. Dent.*, v.22, supl.2, p.6-11, 1994.
- 80 SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J. Dent. Res.*, v.64, sp. iss., p.541-8, 1985.
- 81 SEGURA, J.J., JIMÉNEZ-RUBIO, A., PULGAR, R., OLEA, N., GUERRERO, J.M., CALVO, J.R. In vitro effect of the resin components bisphenol A on substrate adherence capacity of macrophages. *J. Endod.*, v.25, p.341-4, 1999.
- 82 SEGURA, J.J., LLAMAS, R., RUBIO-MANZANARES, A.J., JIMENEZ-PLANAS, A., GUERRERO, J.M., CALVO, J.R. Calcium hydroxide inhibits substrate adherence capacity of macrophages. *J. Endod.*, v.23, p.444-7, 1997.
- 83 SEUX, D., COUBLE, M.L., HATMANN, D.J., GAUTHIER, J.P.,

- MAGLOIRE, H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch. Oral Biol.*, v.36, p.117-28, 1991.
- 84 SHABANHANG, S., TORABINEJAD, M., BOYNE, P.P., ABEDI, H., McMILLAN, P. A comparative study of root end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate in dogs. *J. Endod.*, v.25, n.1, p.1-5, 1999.
- 85 SILVA, L.A.B. *Cimentos obturadores de canal radicular à base de hidróxido de cálcio – avaliação histopatológica do reparo apical e periapical em dentes de cães, da resposta inflamatória em tecido subcutâneo e da migração celular em cavidade peritoneal de camundongos. Análise do pH, concentração de cálcio total e condutividade.* Ribeirão Preto, 1995. 191 p. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 86 SILVA, L.A.B., LEONARDO, M.R., FACCIOLI, L.H., FIGUEIREDO, F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealer. *J. Endod.*, v.23, p.86-90, 1997.
- 87 TAI, K-W., HUANG, F-M, CHANG, Y-C Cytotoxic evaluation of root

canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J. Endod.*, v.27, n.9, p.571-3, 2001.

88 SPANGBERG, L. Biologic effects of root canal filling materials 4. Effect in vitro solubilized root canal filling materials on hela cells. *Odontol. Rev.*, v.20, p.289-99, 1989.

89 SPANGBERG, L.S.W. (Ed.). *Experimental endodontics*. Boca Raton: CRC Press, 1990. 218p.

90 TAGGER, M., TAGGER, E. Subcutaneous reactions to implantation of tubes with AH-26 and Grossman's sealer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.62, p.434-40, 1986.

91 TAGGER, M., TAGGER, E., KFIR, A. Release of calcium and hydroxyl ions from set endodontic sealers containing calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.14, p.878-82, 1988.

92 TAKAHARA, K., ONODERA, A., MATSUMOTO, K. Toxicity of root canal sealers on rat bone cells in primary culture. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.6, p.200-7, 1990.

93 TANOMARU FILHO, M. *Comportamento dos tecidos apicais e*

periapicais de dentes de cães portadores de reação periapical crônica em função da técnica de neutralização do conteúdo séptico-tóxico e do cimento obturador empregado no tratamento endodôntico. Avaliação radiográfica e histopatológica. Araraquara, 1996. 296 p. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

- 94 TEIXEIRA, M.M., WILLIAMS, T.J., HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, v.110, p.,1515-21, 1993.
- 95 TORABINEJAD, M., HONG, C.U., PITT FORD, R.T., KARIYAWASAM, S.P. Tissue reaction to implanted Super-EBA mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J. Endod.*, v.21, p.569-71, 1995.
- 96 TORABINEJAD, M., HONG, C.U., PITT FORD, T.R., KETTERING, J.D. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J. Endod.*, v.21, p.489-92, 1995.
- 97 TRONSTAD, L., BARNETT, F., FLAX, M. Solubility and biocompatibility of calcium hydroxide-containing root canal sealers. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.4, p.152-9, 1988.
- 98 TROWBRIDGE, H.O., EMILING, R.C. *Inflamação: uma revisão do*

processo. 4.ed. São Paulo: Quintessence, 1996. 172p.

- 99 TZIAFAS, D., PANAGIOTAKOPOULOS, N., KOMNENOU, A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine on calcium hydroxide – containing cement. *Arch. Oral Biol.*, v.40, n.1, p.23-31, 1995.
- 100 VAJRABHAYA, L., SITHISARN, P. Multilayer and monolayer cell cultures in cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int. Endod. J.*, v.30, p.141-4, 1997.
- 101 VAJRABHAYA, L., SITHISARN, P., WILAIRAT, P., LEELAPHIWAT, S. Comparison between sulphorhidamina – B dye staining and ^{51}Cr – release method in cytotoxicity assay of endodontic sealers. *J. Endod.*, v.23, p.355-7, 1997.
- 102 VESPA, G.N.R., CUNHA, F.Q., SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vivo. *Infect. Immunol.*, v.62, p.5177-82, 1994.
- 103 WATTS, A., PATERSON, R.C. Initial biological testing of root canal sealing materials: a critical review. *J. Dent.*, v.20, p.259-65, 1992.
- 104 WILLERSHAUSEN, B., MARROQUIN, B.E., SCHAFER, D., SCHULZE,

- R. Citotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J. Endod.*, v.26, p.703-7, 2000.
- 105 WILLIAMS, D.F. Biocompatibility: an overview. In: WILLIAMS, D.F. *Concise enciclopedia of medical and dental materials*. Oxford: Pergamon, 1990. p.51-9.
- 106 YESILSOY, C., FEIGAL, R.J. Effects of endodontic materials on cell viability across standart pore size filters. *J. Endod.*, v.11, p.401-7, 1985.
- 107 ZMENER, O., CABRINI, R.L. Effects of three calcium hidroxide-based materials on human blood monocytes and lymphocytes. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.3, n.1, p.28-32, 1987.
- 108 ZMENER, O., GUGLIELMOTTI, M.B., CABRINI, R.L. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J. Endod.*, v.14, p.229-35, 1988.