



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

TATIANE SAMPAIO BITTENCOURT

**ANÁLISE *IN VITRO* DA N-ACETILCISTEÍNA EM
FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO PERIODONTAL
ESTIMULADOS POR LPS BACTERIANO**

2018

TATIANE SAMPAIO BITTENCOURT

**ANÁLISE *IN VITRO* DA N-ACETILCISTEÍNA EM FIBROBLASTOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL ESTIMULADOS POR LPS
BACTERIANO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Coorientadora: Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Bittencourt, Tatiane Sampaio

Análise in vitro da N-Acetilcisteína em fibroblastos do ligamento periodontal estimulados por LPS bacteriano / Tatiane Sampaio Bittencourt. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Coorientadora: Gleyce Oliveira Silva

1. N-Acetilcisteína. 2. Fibroblastos. 3. Lipopolissacarídeo. 4. Viabilidade Celular. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Camargo, Carlos Henrique Ribeiro, orient. II. Silva, Gleyce Oliveira, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva (Coorientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Universidade Nove de Julho

Campus de São Paulo

Prof. Adj. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Aleteia Massula de Melo Fernandes

Universidade Nove de Julho

Campus de São Paulo

São José dos Campos, 16 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a **Deus**, por me proteger dos perigos da estrada e me proporcionar saúde, equilíbrio e perseverança.

Aos meus amados pais, **Vicente e Geny**, por terem deixado um grande legado: o de correr atrás dos meus sonhos com humildade, esforço, honestidade e dedicação. Saudades eternas.

Ao meu esposo **Cristiano**, amigo e companheiro, cujo apoio foi fundamental; sem ele, este sonho não seria possível.

Aos meus irmãos **Henrique Cesar, Cristiane e Jeniffer** e ao meu amado sobrinho e afilhado **Francisco** e meus cunhados **Denise e Luiz Fernando**, por apoiarem as minhas decisões e se alegrarem com as minhas conquistas. O amor dos nossos pais permanece em nós.

Ao meus sogros **Eloy e Ana Maria**, fonte de inspiração, carinho, presença de Deus e amor. Aos cunhados **André e Cristiane** e aos meus amados sobrinhos **Andrei e Maria Clara**, minha gratidão pelo apoio, pela companhia e pelas vezes em que precisei de abrigo. Muito mais que abrigo, encheram meu coração de amor e tornaram este período mais leve.

Ao (s) meu (s) filho (s) do coração, que um dia vai chegar. Também foi por você (s) que cheguei até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **prof. Dr. Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, por ter me aceitado como orientada, mesmo ciente das minhas limitações. A minha coorientadora, **Profa. Dra. Gleyce Oliveira Silva**, pela parceria nas pesquisas, pela amizade e compreensão nos meus difíceis momentos diante das lutas do dia a dia; pelo sim espontâneo, imediato e gratuito, minha sincera gratidão e carinho. Também à **Profa. Dra. Samira Esteves Camargo** e a **Noala** por todo o auxílio e atenção.

A minha amiga **Monique França**, minha orientadora na prática laboratorial. Muito aprendi, não somente sobre o trato com as células, mas sobre a vida. Que Deus lhe retribua por cada resposta que me deu, sempre de boa vontade e com generosidade. As células nos uniram para a vida.

Aos meus colegas de mestrado, **Amjad Abu Hasna** e **Rayana Duarte Koury**, pela parceria, amizade sincera, ajuda mútua; por cada sorriso, por cada partilha, minha consideração. Desejo sucesso na caminhada profissional e pessoal.

Aos colegas da pós-graduação, **Alessandra, Cassia, Carlos, Christian, Dayana, Diego, Esteban, Fernanda, Felipe Matos** e **Felipe**, pela amizade, companhia e incentivo. A **Lais Landin**, minha gratidão por nunca me dizer não.

Aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora, em especial aos da Endodontia: **Profa. Adj. Marcia Carneiro Valera Garaks, Prof. Dr. Claudio Talge, Prof. Dr. Frederico Martins** e **Profa. Dra. Ana Paula Gomes**, por todos os ensinamentos e pelo acolhimento. Quero destacar o **prof. Dr. Claudio Talge**, pela sincera amizade, por partilhar das minhas dificuldades e conquistas e pelo respeito ao meu profissionalismo.

A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através de seu Diretor, Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara, e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, sob a coordenação do Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.

Ao **Prof. Adj. Eduardo Bresciani**, pela valiosa colaboração no meu Exame de Qualificação, com um equilíbrio fantástico entre gentileza e profissionalismo, e por aceitar colaborar mais uma vez, aceitando fazer parte da banca da Defesa. Por toda educação, sinceridade em nossas conversas e receptividade, meu carinho e gratidão.

Agradeço a **Profa. Adj. Luciane Oliveira Dias**, pela colaboração no meu Exame de Qualificação, pela sinceridade, profissionalismo e por ajudar a dar um rumo concreto ao meu projeto.

A **Profa. Dra. Aleteia Massula de Melo Fernandes**, por aceitar fazer parte deste importante momento em minha vida, pela ajuda nas orientações e prontidão nas respostas, sempre que solicitada.

Aos amigos **Pe. Rodrigo Fernando Alves, Maria Ismênia, José Ricardo, Daniela Boncristiano, Rafael Beck** e aos da minha Equipe de Nossa Senhora: **Pe. Leandro Carlos Pereira, Juliana e Macsi, Mara e Noel, Regiane e Eugenio e Mara e Angelo**. Partilhar com vocês a minha luta e as minhas alegrias durante esta etapa me fortaleceram. Agradeço o carinho, por todas as vezes que perguntaram “como estão as células?” e por acreditarem em mim.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para este desfecho, minha gratidão. Não é possível citar todos os nomes, mas cada um sabe do valor que tem para mim. Deus saberá como recompensá-los. Muito mais que um projeto profissional, hoje um sonho se torna realidade.

"Ninguém vence sozinho. Nem no campo, nem na vida".

Papa Francisco

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 ARTIGO	16
2.1 Artigo – Bittencourt TS, França MCM, Camargo SEA, Silva GO, Camargo CHR. Análise <i>in vitro</i> da N-Acetilcisteína em fibroblastos do ligamento periodontal estimulados por LPS bacteriano / <i>In vitro analysis of N-Acetylcysteine in periodontal ligament fibroblasts stimulated by bacterial LPS</i>.....	16
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	34
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	46
ANEXO.....	53

Bittencourt TS. Análise *in vitro* da N-Acetilcisteína em fibroblastos do ligamento periodontal estimulados por LPS bacteriano [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o comportamento biológico celular da N-Acetilcisteína (NAC), diante da estimulação ou não pelo LPS bacteriano. Foram utilizados fibroblastos do ligamento periodontal, que ficaram em contato por 48 horas com as substâncias testadas: NAC, Hidróxido de cálcio p.a. (HC), Lipopolissacarídeo de *Escheria Coli* (LPS), NAC + LPS e HC + LPS. Para os grupos NAC + LPS, HC + LPS e LPS, as células foram estimuladas com 2µg/mL de LPS por 24 horas, previamente aos tratamentos descritos. Foram realizados os testes biológicos de viabilidade celular (XTT), Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), Elisa (para as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1β e TNF-α) e Micronúcleo (MNT). Os dados foram analisados estatisticamente pela análise descritiva e pelos testes ANOVA e Kruskall Wallis, seguido do teste Dunn ($p < 0.05$) para os testes de XTT, ROS e MNT, e para o teste Elisa foi realizado cálculo das médias e desvio padrão. Os resultados obtidos mostraram que NAC teve um bom comportamento, frente à agressão provocada pelo LPS, quanto à produção de ROS. HC apresentou maior viabilidade celular que NAC, embora NAC não tenha apresentado citotoxicidade. Em relação à expressão das citocinas, NAC foi capaz de reduzir o potencial inflamatório do LPS quando da análise do TNF- α e IL-1β. NAC foi capaz de reduzir a genotoxicidade do LPS, como mostrado pelo teste MNT. Concluiu-se que NAC apresentou um comportamento biológico satisfatório, pela viabilidade celular dos fibroblastos, pela redução da geração de ROS e do potencial inflamatório provocado pelo LPS, e por reduzir a sua genotoxicidade.

Palavras-chave: N-Acetilcisteína. Fibroblastos. Lipopolissacarídeo. Viabilidade celular. Espécies reativas de oxigênio.

Bittencourt TS. *In vitro* analysis of N-Acetylcysteine in periodontal ligament fibroblasts stimulated by bacterial LPS [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the action of N-Acetylcysteine (NAC) and calcium hydroxide (CH) on biological activity, either without or with LPS stimulation in periodontal ligament fibroblasts (PDLF) cells. PDLF were placed in contact with NAC, CH, NAC + LPS, LPS and CH + LPS for 48 hours. PDLF were stimulated by bacterial LPS for 24 hours in NAC + LPS, LPS and CH + LPS groups, before the substances described above are applied. The LPS and NAC effect on cell viability was measured using a XTT test. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated using ROS/superoxide detection kit. Inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β and TNF- α) were evaluated by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay. Genotoxicity was measured using micronucleus test (MNT). The means and standard deviation for all tests were calculated. Data were analyzed statistically by descriptive analysis, ANOVA and Kruskal Wallis tests, followed by Dunn test ($p < .05$). CH was superior to NAC on cellular viability, although NAC was not cytotoxic. The results showed that NAC was able to reduce ROS production of LPS. NAC was able to reduce the inflammatory potential of LPS by decreasing the TNF- α and IL-1 β release. NAC was able to reduce the genotoxicity of LPS. It was concluded that NAC showed a satisfactory biological activity, presenting a minimal effect on cell viability of PDLF cells and reducing ROS production and inflammatory potential provoked by LPS, and to decrease its genotoxicity.

Keywords: N-Acetylcysteine. Fibroblasts. Lipopolysaccharide. Cell viability. Oxigen-reactive species.

1 INTRODUÇÃO

Apesar da correta execução dos protocolos do tratamento endodôntico, como adequado diagnóstico, preparo biomecânico e obturação tridimensional, o insucesso da terapia pode ocorrer, devido a permanência de bactérias e seus subprodutos no interior do canal radicular e região periapical (Dammaschke et al., 2013; Shrivastava et al., 2015). A medicação intracanal é utilizada para eliminar os microrganismos remanescentes ao preparo biomecânico, contidos na luz do canal, nos túbulos dentinários, canais acessórios, deltas e ramificações apicais, além de reduzir a quantidade dos mesmos e de seus subprodutos nos tecidos periapical e periodontal, reduzindo a inflamação nesta região, auxiliando no reparo e alcançando, conseqüentemente, o sucesso da terapia endodôntica (Mohammadi, Dummer, 2011).

Lipopolissacarídeo (LPS) é o principal constituinte da parede celular de bactérias Gram negativas (Martinho et al., 2010), sendo liberado das mesmas quando da sua destruição e morte ou quando da sua replicação, podendo provocar reação inflamatória e reabsorção óssea periapical (Nair, 2004). LPS contém receptores que agem como sinalizadores para a ativação de moléculas regulatórias, como o fator de transcrição kapa, o qual induz a apoptose (Liu et al., 2017). A exposição ao LPS aumenta a formação de óxido nítrico, um mensageiro intercelular, que ativa a resposta imune específica, e também pode levar ao estresse oxidativo (Karapinar et al., 2016). Componentes bacterianos, incluindo o LPS, reagem com monócitos e macrófagos, estimulando a produção de citocinas, sendo as principais delas e de objeto deste estudo: TNF- α , secretada principalmente por macrófagos, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos, provoca estímulo de osteoclastos e linfócitos e aumenta a resposta vascular local (Sousa et al., 2014). A IL-1 β , produzida especialmente por

monócitos e macrófagos, é responsável pelo estímulo de células CD4 ativadas, pela proliferação e ativação de linfócitos B, além de atuar no hipotálamo - funcionando como um agente pirógeno endógeno -, e aumentar a atividade da coagulação (Lin et al., 2015). A IL-6, predominantemente produzida por linfócitos B e T e monócitos, representa um dos maiores mediadores da inflamação, provoca a quimiotaxia de eosinófilos, e tanto o TNF- α quanto a IL-1 estimulam a sua produção (Lyngstadaas et al., 2001). A IL-8 é secretada especialmente por monócitos e macrófagos e funciona como estímulo para a migração de neutrófilos, sendo que IL-1 também estimula a sua produção (Nasser et al., 2009; Cvikl et al., 2015). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, produzida predominantemente por células CD8 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos, e inibe a síntese de outras citocinas, além de agir como coestimuladora da proliferação de mastócitos (Baek et al., 2013).

Diante de um agente agressor, como o LPS bacteriano, as células de defesa, além da liberação de citocinas, produzem grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), conhecidas como radicais livres, sendo os principais a água oxigenada, o íon hidroxila e o oxigênio singlete, ou seja, são moléculas altamente reativas ao oxigênio, produzidas principalmente pelas mitocôndrias, e representam um subproduto metabólico natural, liberado durante a conversão da molécula de oxigênio em água, por transferência de elétrons, funcionando como uma importante via de sinalização para a proliferação e a sobrevivência da célula (Zafarullah et al., 2003). As espécies de ROS são geradas por enzimas como oxidases NADPH e cicloxigenases, e também pela cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, e sua geração ocorre em equilíbrio com os captadores de ROS, em especial enzimas e pequenas moléculas como a glutationa (GSH), ou seja, quando há um desequilíbrio do estado redox da célula, um desbalanço entre os oxidantes e os mecanismos antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, podendo gerar morte celular ou apoptose (Schafer, Buettner, 2001). Diante do

estresse oxidativo, uma das vias de sinalização ativada é a do fator kappa, o qual estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e destruição tecidual; a outra, é pela ativação da kinase C-jun N-terminal (JNK), responsável pela apoptose (Lappas et al., 2003; Liu et al., 2017). O LPS induz efeitos citotóxicos, como a apoptose, em consequência do estresse oxidativo (Schweikl et al., 2016). O conhecimento sobre a formação de ROS promove uma outra perspectiva no entendimento das respostas celulares aos materiais e substâncias de teste, pois se a geração de ROS for muito maior do que a capacidade de redução dos seus captadores, podem ocorrer danos biológicos a macromoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA, através da indução da peroxidação de lipídeos, com consequente destruição da membrana celular, além de denaturação proteica e desativação de enzimas, o que leva a danos no ácido nucleico, representados por quebras de pares de base, gerando mutação gênica e rompimento de cadeias de cromossomos (Schweikl et al., 2007; Styllou et al., 2015; Nguyen et al., 2017).

Diante de todas as consequências causadas por agentes agressores, há necessidade do uso da medicação intracanal, na tentativa de eliminar microrganismos remanescentes ou seus subprodutos, do interior do sistema de canais radiculares, e o Hidróxido de Cálcio p.a. (HC) é a medicação intracanal mais utilizada, sendo associado a veículos que facilitam a sua ação e difusão (Ordinola-Zapata et al., 2015). Ele possui efeito antimicrobiano e auxilia no processo de reparo periapical, devido a dissociação do íon cálcio (Ca^+) do íon hidroxila (OH^-), promovendo um pH alcalino, além de interagir com a parede celular do microrganismo e inativar a ação nociva dos subprodutos bacterianos, como as endotoxinas (Midena et al., 2015). Seu alto pH também provoca alteração no LPS, por atuar na sua porção lipídica, transformando-a em uma unidade não tóxica, e por inativar os mecanismos de transporte da membrana celular do microrganismo (Mohammadi, Dummer, 2011) . Porém, estudos *in vitro* tem demonstrado que o HC pode induzir a produção de espécies reativas

de oxigênio (ROS), pelo ambiente de pH alcalino (Baldini et al., 2003). Quando em contato direto com o tecido, o HC pode gerar toxicidade, já que, em geral, a pasta é bem tolerada pelos tecidos ósseo e pulpar, porém sobre o tecido periodontal, pode induzir respostas teciduais indesejáveis (Midena et al., 2015). O ambiente alcalino pode favorecer a fosforilação de proteínas, com fragmentação do DNA, podendo levar a célula a entrar em apoptose, devido à formação de ROS e ativação da JNK (Grossmann et al., 2004). Sobre a ação antimicrobiana, para algumas espécies, como *Enterococcus faecalis*, HC é ineficaz em eliminá-lo completamente, sendo o principal microrganismo relacionado a infecções secundárias e persistentes (McHugh et al., 2004).

N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante não enzimático, utilizado para tratamento, em especial, de doenças pulmonares, facilmente absorvido pelas células e desacetilado enzimaticamente para L-cisteína, base da glutathione, cuja fração ativa da NAC é o sítio tiol (SH), onde ocorre a ligação química com o grupo dissulfeto do LPS e dos radicais livres (Spagnuolo et al., 2013; Karapinar et al., 2016). NAC pode agir diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio, através da ligação química da porção sulfidrilica com o oxigênio; pode atuar através do sistema da glutathione, pela desacetilação enzimática e conversão em L-cisteína, renovando o estoque de antioxidantes intracelulares; ou ainda, através da tioredoxina, envolvida na redução de dissulfetos (Sadowska et al., 2007). Com a redução do estresse oxidativo, ocorre diminuição da sinalização iniciada pelo fator kappa, inibindo significativamente a resposta inflamatória, e vários estudos mostraram que NAC aumentou a viabilidade celular, mesmo na presença de agentes agressores e estimuladores da formação de ROS, como metacrilatos e LPS, causando um efeito protetor sobre as células, já que o seu grupo tiol nucleofílico se liga à porção carbônica do metacrilato, minimizando o efeito tóxico do mesmo e, da mesma forma, liga-se ao grupo dissulfeto do LPS, tornando-o não citotóxico (Schweikl et al., 2016). Um efeito direto das

propriedades antioxidantes da NAC é restaurar o estado redox da célula, modulando o seu estresse oxidativo, bem como o efeito inflamatório causado por agentes agressores (Sadwoska et al., 2007). Frente a um agente agressor, NAC pode restaurar a viabilidade celular e, quando incorporada a outras substâncias de potencial celular agressivo, ela pode torná-lo biocompatível (Kojima et al., 2008; Yamada et al., 2009). NAC também pode atuar como inibidor da liberação de TNF- α , da ativação de citocinas pró-inflamatórias e da apoptose celular (Demiralay et al., 2006; Ancha et al., 2008), pelos mecanismos anteriormente descritos, além de diminuir a migração leucocitária (Zhang et al., 2007).

Além da alteração da viabilidade celular, genotoxicidade pode ocorrer quando substâncias com potencial citotóxico entram em contato com a célula, provocando a superprodução de ROS, o que limita a capacidade de reação dos mecanismos oxidativos intracelulares, permitindo que ROS interaja com macromoléculas, como DNA, lipídeos e proteínas (Schweikl et al., 2007). As interações de ROS com DNA podem resultar em lesões que causam o bloqueio da progressão da replicação, levando à formação de quebras no DNA de cadeia dupla, durante a transdução do sinal cromossômico, o que desencadeia, por vez, interrupção do ciclo celular e indução de morte celular (Styllou et al., 2015). A genotoxicidade pode ser avaliada pelo ensaio de Micronúcleo (MNT), o qual avalia quantitativamente o dano celular cromossômico causado por efeitos de tratamento com diferentes materiais (Huang et al., 2011).

Para que um material ou produto possa ser utilizado com segurança no interior do canal radicular, deve-se verificar a sua biocompatibilidade e, para tanto, a avaliação da toxicidade é de extrema importância, pois permite esclarecer o mecanismo biológico pelo qual o efeito citotóxico é produzido (Scelza et al., 2001). Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos estudos *in vivo*, uma vez que podem limitar o número de variáveis

experimentais, a obtenção de dados significativos de forma mais facilitada, além de se ter maior controle sobre os períodos experimentais (Scelza et al., 2001). A presença do efeito tóxico *in vitro* não significa que o material seja tóxico quando aplicado *in vivo*, porém a ausência do efeito tóxico *in vitro* é garantia de uma boa resposta clínica (Senne et al., 2009). O teste de XTT é utilizado para determinar a proliferação e a viabilidade celular por quantificação espectrofotométrica, em resposta a fatores de crescimento, citocinas e nutrientes, com base na conversão do sal de tetrazólio por células metabolicamente viáveis (Torun et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biológico da NAC em fibroblastos do ligamento periodontal, quanto a viabilidade celular, a produção de ROS, a formação de micronúcleo e ao potencial inflamatório, frente à agressão causada pelo LPS bacteriano.

2 ARTIGO

2.1 Artigo – Bittencourt TS, França MCM, Camargo SEA, Silva GO, Camargo CHR. Análise *in vitro* da N-Acetilcisteína em fibroblastos do ligamento periodontal estimulados por LPS bacteriano / *In vitro analysis of N-Acetylcysteine in periodontal ligament fibroblasts stimulated by bacterial LPS**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o comportamento biológico celular da N-Acetilcisteína (NAC), diante da estimulação ou não pelo LPS bacteriano. Foram utilizados fibroblastos do ligamento periodontal, que ficaram em contato por 48 horas com as substâncias testadas: NAC, Hidróxido de cálcio p.a. (HC), Lipopolissacarídeo de *Escheria Coli* (LPS), NAC + LPS e HC + LPS. Para os grupos NAC + LPS, HC + LPS e LPS, as células foram estimuladas com 2µg/mL de LPS por 24 horas, previamente aos tratamentos descritos. Foram realizados os testes biológicos de viabilidade celular (XTT), Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Elisa (para as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1β e TNF-α). Os dados foram analisados estatisticamente pela análise descritiva e pelos testes ANOVA e Kruskal Wallis, seguido do teste Dunn ($p < 0.05$) para os testes de XTT e ROS, e para o teste Elisa, foi realizado o cálculo das médias e desvio padrão. Os resultados obtidos mostraram que NAC reduziu a produção de ROS, quando da presença do LPS. HC apresentou maior viabilidade celular que NAC, embora NAC não tenha sido citotóxica. Em relação à expressão das citocinas, NAC foi capaz de reduzir o potencial inflamatório do LPS quando da análise do TNF-α e IL-1β. Concluiu-se que NAC apresentou um bom comportamento biológico, pela viabilidade celular dos fibroblastos, pela redução da geração de ROS e do potencial inflamatório provocado pelo LPS.

Palavras-chave: N-Acetilcisteína. Fibroblastos. Lipopolissacarídeo. Viabilidade celular. Espécies reativas de oxigênio.

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Journal of Endodontics* (Print Version ISSN 0099-2399).

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate in vitro the action of N-Acetylcysteine (NAC) and calcium hydroxide (CH) on biological activity, either without or with LPS stimulation in periodontal ligament fibroblasts (PDLF) cells. PDLF were placed in contact with NAC, CH, NAC + LPS, LPS and CH + LPS for 48 hours. PDLF were stimulated by bacterial LPS for 24 hours in NAC + LPS, LPS and CH + LPS groups, before the substances described above are applied. The LPS and NAC effect on cell viability was measured using a XTT test. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated using ROS/superoxide detection kit. Inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β and TNF- α) were evaluated by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay. The means and standard deviation for all tests were calculated. Data were analyzed statistically by descriptive analysis, ANOVA and Kruskal Wallis tests, followed by Dunn test ($p < .05$). CH was superior to NAC on cellular viability, although NAC was not cytotoxic. The results showed that NAC was able to reduce ROS production of LPS. NAC was able to reduce the inflammatory potential of LPS by decreasing the TNF- α and IL-1 β release. It was concluded that NAC showed a satisfactory biological activity, presenting a minimal effect on cell viability of PDLF cells and reducing ROS production and inflammatory potential provoked by LPS.

Keywords: N-Acetylcysteine. Fibroblasts. Lipopolysaccharide. Cell viability. Oxigen-reactive species.

INTRODUCTION

Intracanal medication is indicated to eliminate remaining microorganisms and reduce the inflammatory potential, thus aiding in the repair of periapical tissues (1). Calcium hydroxide (CH) is used as an intracanal medication and it has antimicrobial effect due to its dissociation into Ca⁺ and OH ions, promoting an alkaline pH, interaction with the microorganism cell wall, and inactivating bacterial byproducts such as endotoxin (2). However, in vitro studies have demonstrated that CH can induce ROS production in alkaline pH environments, while others report a decrease in ROS production (3, 4, 5).

Lipopolysaccharide (LPS) is the major constituent of the outer cell wall of Gram negative bacteria, secreted by growing organisms or released during disintegrations of bacteria after death (6). It is one of the most important constituent involved in the development of periapical inflammation, activating immune competent cells and leading to the release of pro-inflammatory cytokine as IL-1 β (7). Exposure to LPS activates the cellular stress response, which results in apoptosis and cell death (8). Inflammation and oxidative stress occur at the same time and antioxidants may inhibit the process (9).

N-Acetylcysteine (NAC) - a thiol agent - which is the precursor of L-cysteine, has a constitutive basis glutathione (10), being a source of sulfhydryl groups and acting as a remover of reactive substances such as OH and H₂O₂ (11). A direct impact of the antioxidant properties of NAC is to restore the redox state of the cell by modulating its oxidative stress as well as the inflammatory effect of aggressive agents (12). Facing an aggressor agent, NAC can restore cell viability and, when incorporated into other substances of aggressive cellular potential, it can make it biocompatible (13, 14). NAC contributes to the synthesis of glutathione - one of the most important detoxifiers in the human body - which plays a key role in cellular homeostasis, since glutathione depletion can cause cell death (13). NAC can also act directly by reducing Reactive Oxygen Species (ROS) levels (10), inhibiting TNF- α release and decreasing cellular apoptosis (15, 16). So, NAC exerts anti-inflammatory activity through its ability to inhibit the expression and release of various proinflammatory cytokines (12) such as IL-6 (17), IL-8 (18) and IL-1 β (19). NAC has antioxidant activity because it is able to sequester free radicals, thus restoring the redox state of the cell, which is modified when an aggressor agent is present, hence allowing modulation of intracellular signaling (12), in addition to decreasing leukocyte migration (20).

The aim of the present study was to evaluate the biological performance of NAC in the cell viability of periodontal ligament fibroblasts, ROS production, as well as its inflammatory potential and its behavior against the bacterial LPS.

METHODS

Cell culture

Periodontal ligament fibroblasts (PDFL, Lonza, Walkersville, MD, USA) were cultured for 48 hours in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), supplemented by 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% antimycotic/antibiotic solution (Lonza) at 37°C and 5% CO₂.

Experimental Groups

For the LPS, NAC + LPS and CH + LPS groups, 2 µg/mL Escherichia coli LPS (L4391, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) were used, remaining in contact with the cells for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. In NAC, CH and C- (Negative Control = culture medium DMEM + cells) groups, the culture medium (DMEM) was only replaced and cell cultures incubated for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. After that the culture medium was replaced in all groups and the treatment substances were applied (Table 1) and incubated at 37°C and CO₂ for 48 hours.

Cell Growth and Viability [XTT-Assay]

Cells (8×10^3) were seeded in each well of a 96-well plate and incubated for 24 hours at 37°C (5% CO₂). Cultures were then exposed to 200µL of the treatment substances. After 48 hours, 200µL of XTT solution (2H-tetrazolium,2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)

carbonyl]-hydroxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was placed and incubated for 3 hours. The XTT is converted by the cell metabolism in a water-soluble formazan salt, which results in an orange color. The optical density was read in a microplate reader (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) at 490 nm. This experiment was performed in triplicate to improve the reliability of the results. The absorbance value readings were normalized to untreated control cultures and differences between median values were statistically analyzed by using Kruskal-Wallis test for comparison among groups and Dunn multiple comparison post test, with significance of $P < .05$.

ROS

Each well of the 6-well plate was seeded with 3×10^5 cells in 2,5 mL DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin, and incubated for 24 hours at 37°C and 5% CO₂. Treatments were applied and cells were incubated for 48 hours at 37°C and 5% CO₂. Cells were harvested in 1 mL of DMEM culture medium and transferred to eppendorfs. Levels of intracellular ROS were measured with ROS assay kit (Life Technologies, USA), according to manufacturer's instructions. There is a positive test control (test C+), composed of 200 µM tert-butyl hydroperoxide solution (TBHP), and a negative test control (test C-) composed of 5 mM NAC, according to Positive test control, according to manufacturer's kit. Samples were analyzed on a flow cytometer in red filter at 639 nm. This experiment was performed in triplicate to improve the reliability of the results. Differences between median values were statistically analyzed by using the Kruskal-Wallis test for comparisons among groups, with significance of $P < .05$.

Inflammatory Potential (ELISA-Assay)

Conditioned medium generated by experimental groups in PDLF for 48

hours was collected and used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by Quantikine Colorimetric Sandwich ELISAs (R&D Systems), according to manufacturer's instructions. Supernatant was added to each well of a 96-well plate containing IL-6, IL-8, IL-1, IL-1 β and TNF- α . Optical density was analyzed in spectrophotometer (450 nm).

RESULTS

Cell Growth and Viability [XTT-Assay]

To compare the distribution of cell viability data between groups, Kruskal-Wallis test indicates that the values differ between groups ($kw = 50.14$; $df = 5-1=4$; $p\text{-value} = 0.001 < 0.05$). Post hoc, the multiple comparisons' Dunn test (5%) was applied and group's formations were established (Fig. 1). In none of the groups the substances tested showed cytotoxicity, and CH presented the highest cellular viability ($2,88 \pm 0,15$), even with the cellular stimulus provoked by LPS. NAC ($0,80 \pm 0,23$) and NAC + LPS ($0,77 \pm 0,32$) groups were not different from the Negative Control group (C-)($0,78 \pm 0,09$) and did not present cytotoxicity values (Table 2).

ROS

There was significant difference between the groups ($p < .05$) (Fig. 2) and there was a higher ROS production in LPS group ($29 \pm 27,87$) in relation to the negative test control ($1,66 \pm 1,52$). It was observed that in NAC ($1,33 \pm 1,52$) and NAC + LPS groups ($3 \pm 4,35$) there was a lower ROS production in relation to the LPS and positive test control (43 ± 3). CH + LPS ($0,33 \pm 0,57$) group there was less ROS production than CH group ($2 \pm 2,64$). All data are presented in Table 3.

Elisa assay

The expression of the cytokines used in this study is shown in Figure 3 and Table 4. Among the different protocols tested for TNF- α , the lowest expression occurred in the CH group (19,67 pg/mL), followed by the NAC + LPS (22,5 pg/mL) and it was found that the NAC (55,8 pg/mL) and CH + LPS (50,48 pg/mL) were similar. As for IL-1 β , NAC + LPS group had the lowest inflammatory potential (225,65 pg/mL) and CH the highest (313,35 pg/mL). NAC presented the lowest inflammatory potential (48,21 pg/mL), followed by CH + LPS (70,72 pg/mL), LPS (89,64 pg/mL), CH (181,43 pg/mL) and NAC + LPS (225,35 pg/mL) for IL-6. NAC presented the lowest inflammatory potential for IL-8 (94,61 pg/mL), followed by LPS (119,22 pg/mL) and when CH and NAC were associated with LPS the expression of this cytokine increased in a high scale (NAC + LPS = 2085,77 pg/mL; CH + LPS = 2290,76 pg/mL). Among the treatment groups, the lowest IL-10 expression occurred in the CH group (52,85 pg/mL), followed by LPS (56,42 pg/mL), CH + LPS (72,85 pg/mL), NAC (94,28 pg/mL) and NAC + LPS (99,29 pg/mL), respectively.

DISCUSSION

In the present study CH and CH + LPS did not show cytotoxicity by XTT test, being better as cell viability than NAC and NAC+LPS. It is interesting to note that the presence of LPS in both the CH group and the NAC group does not decrease the cell viability, indicating the potential of the two substances tested to attenuate the cytotoxic effect of LPS compared to the negative control. The lipid part in LPS promotes a strong negative charge that can be neutralized with positively charged molecules (21). We believe that CH precipitation may have occurred, which leads us to think of reducing the CH concentration for future

research. The potential of NAC in attenuating the cytotoxicity of various biomaterials has been shown using fibroblasts and osteoblasts (10). Jahromi et al.(22), found that CH reduced fibroblast viability, significantly more than propolis, in agreement with Eick et al. (23), who observed that a remarkable higher percentage of dead cells was found after pretreatment with 1.5 mg CH in comparison with control (no treatment), in PDFL as well. The potential of NAC in attenuating the cytotoxicity of various biomaterials has been shown using fibroblasts and osteoblasts (10). Also, Minamikawa et al. (24) found potential improvement of resin-modified glass ionomers (RMGI) cytotoxicity by NAC when analyzed by cell viability/apoptosis assay and flow cytometric results showed that the percentage of viable dental pulp cells after 24 hours cultured was 46.7% on untreated RMGI, while it increased to 73.3% on 25 mM NAC-supplemented RMGI.

Reactive oxygen specie is a natural byproduct of normal oxygen metabolism and has been found to play important roles in cell signaling, proliferation and survival and at low concentrations ROS stimulate the proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs) in culture (10), while at higher concentrations they may have cytotoxic effects (8). DNA methylation, which affects its structure and, consequently, the development of the cell, may be taken up by B cells and monocytic cells via adsorptive endocytosis into an acidified intracellular compartment. Acidification of CpG DNA may be a necessary step to induce sequence specific generation of intracellular ROS. These ROS, generated via a pH-dependent, generate subsequent NF κ B activation. These steps can be inhibited by antioxidant NAC (25). NF- κ B has long been considered a prototypical proinflammatory signaling pathway, largely based on its activation by proinflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- α , and the role of NF- κ B in the expression of other proinflammatory genes including cytokines, chemokines,

and adhesion (26). In the present study, in the LPS group there was a higher ROS generation. CH + LPS group we verified the lowest result that is, there was a lower ROS generation. We believe that new concentrations of CH for use in cell culture should be researched in the future, because there may have been a precipitation of CH, just as it may have occurred in the XTT test. However, NAC was effective in reducing ROS generation when compared to the NAC + LPS and LPS groups, being in agreement with Nandate et al., 2005 (18), Zhang et al., 2007 (20), Quah et al., 2012 (27) and Schweikl et al., 2016 (28).

LPS induces the production of cytokines, including TNF- α , by fibroblasts, macrophages and other cells that are able to induce osteoclast formation and activation, and it can promote osteoclast differentiation, fusion, survival and activation, regardless of IL-1 and TNF- α (21). In relation to the cytokines evaluated in our study, NAC induced higher TNF- α expression, followed by LPS, but NAC attenuated induction caused by LPS better than CH. Similarly, NAC reduced IL-1 β expression better than CH, and the highest expression was found in the CH group. As for IL-6, the NAC group was the least likely to induce expression, but when LPS was present, CH was more effective in reducing its expression than NAC. For IL-8, NAC was able to significantly attenuate its expression; however, when LPS was present, neither NAC nor CH was able to reduce the expression of this cytokine. As for IL-10 the LPS and NAC + LPS groups were statistically similar. Karapinar et al. (9) investigated the effect of NAC by comparing it with CH and pro- and anti-inflammatory cytokines and observed that both materials had similarly strong anti-inflammatory effect in LPS-stimulated human promonocytic cell line (THP-1). The active moiety of NAC is the thiol (-SH) site, which plays a role in free radicals scavenging and destruction of intermolecular or intramolecular disulfide bonds in proteins, as LPS (9). NAC reacts with -SH groups with the disulfide bonds of LPS and is capable of disrupting the disulfide bonds of LPS

constituent enzymes (29). In our study, when LPS was present NAC attenuated the production of cytokines, probably by the destruction of their enzymes, which made it less aggressive for the fibroblasts tested. Glutathione is the main molecule in the intracellular antioxidant system (10). NAC exerts anti-inflammatory activity through its ability to inhibit the expression and release of various proinflammatory cytokines (12). In human airway smooth muscle cells, NAC has been reported to decrease the IL-1 β -induced expression and production effects of NAC on endodontic pathogen 323 of eotaxin and monocyte chemoattractant protein-1 (17). It has also been observed that NAC inhibits IL-8-induced up-regulation of CD11b in human whole blood (16). NAC directly neutralizes ROS by donating a hydrogen atom from its thiol group and the addition of NAC to culture was shown to inhibit triethylene glycol dimethacrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate induced cell death in fibroblasts and dental pulp cells (13). According to the present study, NAC was able to preserve the cellular viability of the fibroblasts of the periodontal ligament and decreased the production of ROS against the aggression caused by LPS. In addition, under the LPS stimulus, NAC was able to attenuate the expression of TNF- α and IL-1 β .

It was concluded that NAC showed a satisfactory biological activity, presenting a minimal effect on cell viability of PDLF cells and reducing ROS production and inflammatory potential provoked by LPS.

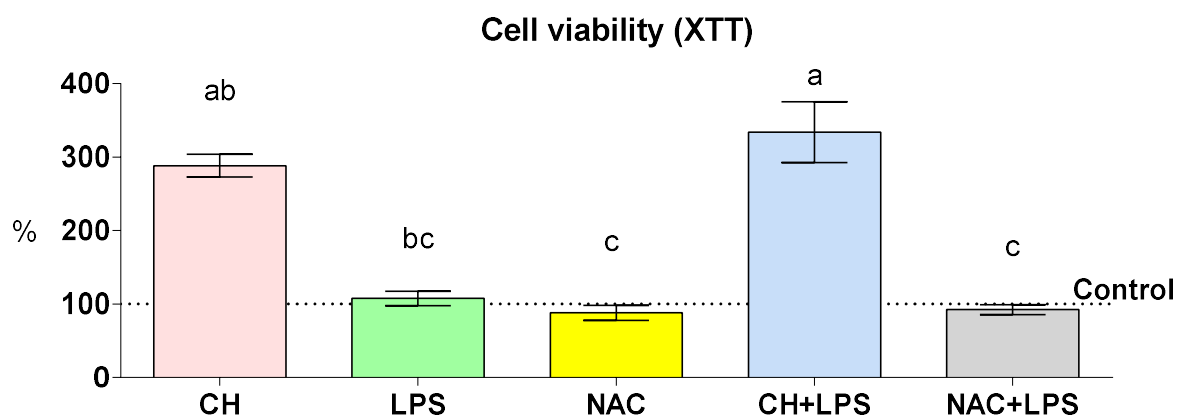


Figure 1. Bar graph (median \pm interquartil range) for cell viability data by groups normalized by the control. Means followed same letter no differ statistically (Dunn (5%) test).

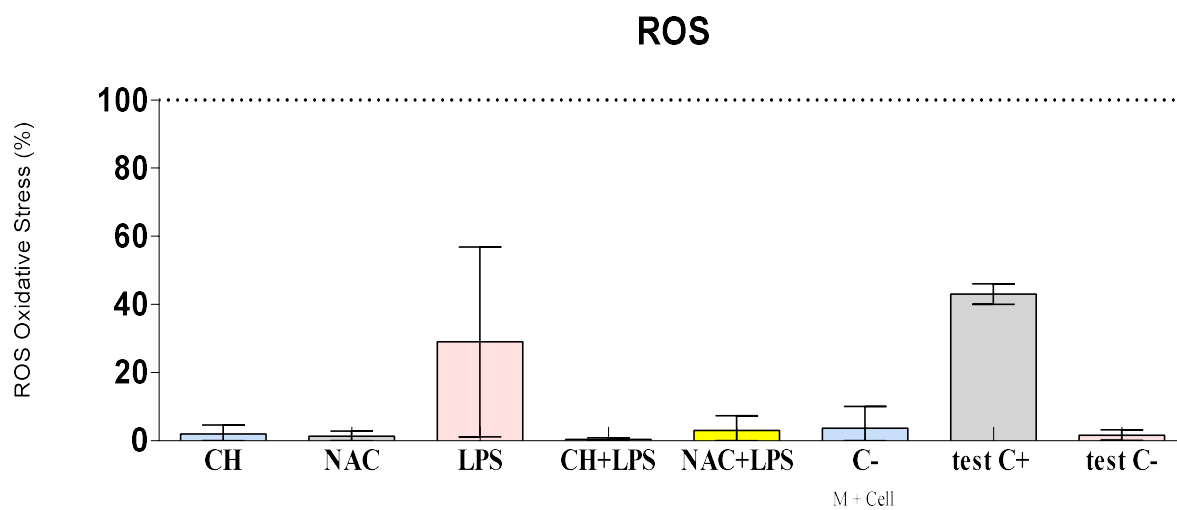


Figure 2. Bar graph (median \pm interquartile range) for ROS oxidative stress production.

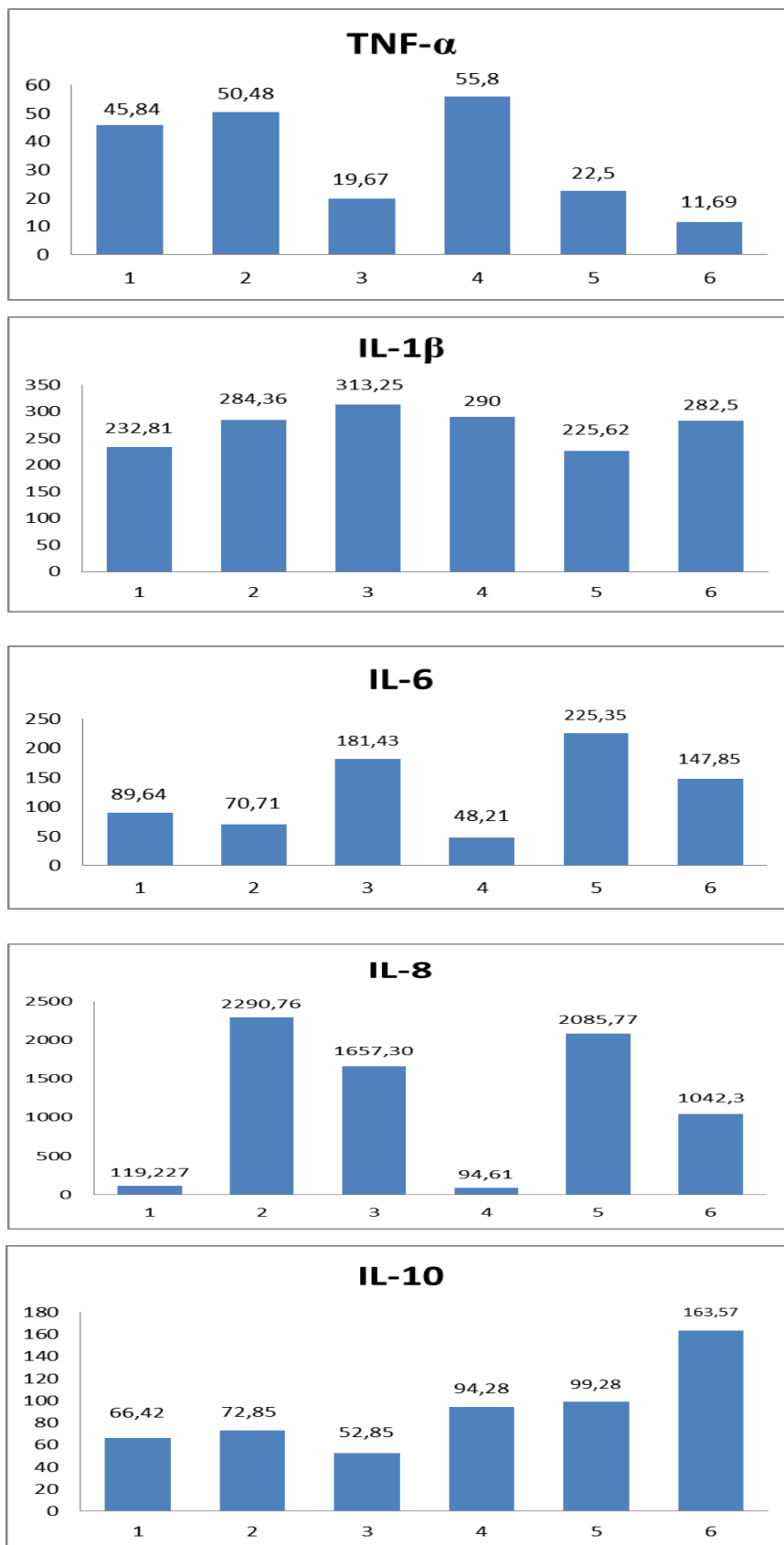


Figure 3. Graphs of the means of interleukins in PDFL cells
 1, LPS; 2, CH+LPS; 3, CH; 4, NAC; 5, NAC+LPS; 6, C-.

TABLE 1. Experimental Groups

Experimental Groups	Specifications	Trade Mark
CH	2 mg/mL	<i>Biodinâmica, Brazil</i>
NAC	10 mM NAC 2 mL NAC/mL culture medium	<i>Sigma Aldrich, St. Louis, USA</i>
LPS	2 µg/mL <i>Escherichia coli</i> LPS	<i>L4391, Sigma Aldrich, St. Louis, USA</i>
CH + LPS	2 mg/mL CH + 2 µg/mL LPS	
NAC + LPS	2 mL NAC/mL culture medium + 2 µg/mL LPS	
C-	2 mL culture medium + PDFL	

CH, Calcium Hydroxide; NAC, N-Acetylcysteine; LPS, Lipopolysaccharide; CH + LPS, Calcium Hydroxide + Lipopolysaccharide; NAC + LPS, N-Acetylcysteine + Lipopolysaccharide; C-, Negative Control.

TABLE 2. Mean, Standard Deviation (SD), Minimum and Maximum of XTT test

Groups	Mean	SD	Minimum	Maximum
<i>CH</i>	2.88	0.15	2.64	3.23
<i>NAC</i>	0.80	0.23	0.10	0.97
<i>LPS</i>	0.24	0.32	0.10	0.94
<i>CH + LPS</i>	3.34	0.41	2.79	4.24
<i>NAC + LPS</i>	0.77	0.32	0.10	0.99
<i>C-</i>	0.78	0.09	0.57	0.88

CH, Calcium Hydroxide; *NAC*, N-Acetylcysteine; *LPS*, Lipopolysaccharide; *CH + LPS*, Calcium Hydroxide + Lipopolysaccharide; *NAC + LPS*, N-Acetylcysteine + Lipopolysaccharide; *C-*, Negative Control.

TABLE 3. Mean, Standard Deviation (SD), Minimum and Maximum for ROS (%)

Groups (n = 6)	Mean	SD	Minimum	Maximum
<i>CH</i>	2	2,64	0	5
<i>NAC</i>	1,33	1,52	0	3
<i>LPS</i>	29	27,87	6	60
<i>CH + LPS</i>	0,33	0,57	0	1
<i>NAC + LPS</i>	3	4,35	0	8
<i>C-</i>	3,66	6,35	0	11
<i>Test C+</i>	43	3	40	46
<i>Test C-</i>	1,66	1,52	0	3

CH, Calcium Hydroxide; *NAC*, N-Acetylcysteine; *LPS*, Lipopolysaccharide; *CH + LPS*, Calcium Hydroxide + Lipopolysaccharide; *NAC + LPS*, N-Acetylcysteine + Lipopolysaccharide; *C-*, Negative Control; *Test C+*, ROS test positive control; *Test C-*, ROS test negative control.

TABLE 4. Means of Elisa assay data (pg/mL)

Groups	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10
<i>CH</i>	19.67	313.35	181.43	1657.3	52.85
<i>NAC</i>	55.8	290	48.21	94.61	94.28
<i>LPS</i>	45.84	232.81	89.64	119.227	56.42
<i>CH + LPS</i>	50.48	284.36	70.72	2290.76	72.85
<i>NAC + LPS</i>	22.5	225.65	225.35	2085.77	99.28
<i>C-</i>	11.69	282.5	147.85	1042.3	163.57

CH, Calcium Hydroxide; *NAC*, N-Acetylcysteine; *LPS*, Lipopolysaccharide; *CH + LPS*, Calcium Hydroxide + Lipopolysaccharide; *NAC + LPS*, N-Acetylcysteine + Lipopolysaccharide; *C-*, Negative Control.

REFERENCES

- 1 Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011;44(8):697-730.
- 2 Midena RZ, Garcia RB, Cavenago BC, et al. Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. *J Appl Oral Sci.* 2015 Oct;23(5):508-14.
- 3 Baldini PM, De Vito P, Martino A, et al. Differential sensitivity of human monocytes and macrophages to ANP: a role of intracellular pH on reactive oxygen species production through the phospholipase involvement. *J Leukoc Biol* 2003;73:502–10.
- 4 Yeung SY, Huang CS, Chan CP. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J* 2007;40(11):837-44.

- 5 Eid AA, Gosier JL, Primus CM, et al. *In vitro* biocompatibility and oxidative stress profile of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod* 2014;40(2):255-60.
- 6 Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Med* 2004;15:348–81.
- 7 Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod* 2010;36:1766–9.
- 8 Liu L, Huang R, Yang R, Wei X. OCT4B1 regulates the cellular stress response of human dental pulp cells with inflammation. *Biomed Res Int* 2017;2017:2756891.
- 9 Karapinar SP, Ulum YZA, Ozelik B, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol* 2016;68:48-54.
- 10 Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater* 2007;23:688-95.
- 11 Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Amad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine action. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(1):6-20.
- 12 Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant *in vitro* and *in vivo* dose-effect: a review. *Pulm Pharmacol Ther* 2007;20(1):9-22.
- 13 Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, et al. Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetylcysteine (NAC). *Dent Mat* 2008;24:1686–93.
- 14 Yamada M, Kojima N, Att W, et al. N-Acetylcysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental-resin extract. *Redox Rep* 2009;14(22):13-22.
- 15 Demiralay R, Gursan N, Erdem H. Regulation of sepsis-induced apoptosis of pulmonary cells by posttreatment of erdosteine and N-acetylcysteine. *Toxicology*. 2006;228:151-61.

- 16** Ancha HR, Kurella RR, McKimney CC, et al. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2009;54(4):758-66.
- 17** Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-Acetylcysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappa B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(4):1723-9.
- 18** Nandate K, Ogata M, Tamura H, et al. N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced adhesion molecule expression in human whole blood. *Anesth Analg* 2005;100(5):1453-7.
- 19** Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, et al. Modulation by cAMP of IL-1beta-induced eotaxin and MCP-1 expression and release in human airway smooth muscle cells. *Eur Respir J* 2003;22(2):220-6.
- 20** Zhang XY, Hayasaka S, Hayasaka Y, et al. Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51(1):14-20.
- 21** Burns MR, Jenkins SA, Wood SJ, et al. Structure-activity relationships in lipopolysaccharide neutralizers: design, synthesis, and biological evaluation of a 540-membered amphipathic bisamide library. *J Comb Chem* 2006;8:32-43.
- 22** Jahromi ZM, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp fibroblasts. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2014;8(3):130-3.
- 23** Eick S, Strugar T, Miron RJ, Sculean A. In vitro activity of oily calcium hydroxide suspension on microorganisms as well as on human alveolar osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts. *BMC Oral Health* 2014;14:9.
- 24** Minamikawa H, Yamada M, Iwasa F, et al. Amino acid derivated-mediated detoxification and functionalization of dual cure dental restorative material for dental pulp cell mineralization. *Biomaterials* 2010;31(28):7213-25.
- 25** Yi AK, Tuetken R, Redford T, et al. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol.* 1998;160:4755-61.
- 26** Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24:981-90.

27 Quah SY, Wu S, Lui JN, et al. *N-Acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of Enterococcus faecalis. J Endod* 2012;38(1):81-5.

28 Schweikl H, Widbiller M, Krifka S, Klement J, et al. *Interaction between LPS and a dental resin monomer on cell viability in mouse macrophages. Dent Mater* 2016;1492-503.

29 Sevier CS, Kaiser CA. *Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:836-47.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A medicação intracanal é fundamental na terapia endodôntica, tanto para auxiliar na neutralização de toxinas e na destruição de microrganismos que permanecem após o preparo biomecânico, quanto para a estimulação do reparo da região periapical e a mais utilizada é o hidróxido de cálcio (HC), um pó branco, inodoro, que libera íons hidroxílicos altamente reativos em fluidos aquosos que danificam as membranas citoplasmáticas, proteínas e DNA (Mohammadi, Dummer, 2011). A pasta HC é o medicamento intracanal mais comum utilizado na endodontia, devido às propriedades biológicas e por sua ação antimicrobiana (Kitikuson, Srisuwan, 2016), capacidade de hidrolisar LPS de bactérias Gram negativas (Schresta et al., 2017) e de estimular o reparo por deposição de tecido mineralizado (Mohammadi, Dummer, 2011), e baixa citotoxicidade (Schuurs et al., 2000). No presente estudo, HC e HC + LPS não mostraram citotoxicidade, conforme avaliado pelo teste XTT, sendo melhor que NAC e NAC + LPS. É interessante notar que a presença de LPS no grupo HC e no grupo NAC não diminuiu os valores de viabilidade celular, indicando o potencial das duas substâncias testadas na atenuação do efeito citotóxico do LPS e, em comparação com o grupo C-, NAC foi semelhante a esse, sendo o LPS o mais citotóxico. A fração lipídica do LPS provoca uma carga negativa que pode ser neutralizada com moléculas positivamente carregadas (Burns et al., 2006). Jahromi et al. (2014), observaram uma redução da viabilidade de fibroblastos quando tratados com HC, sendo significativamente maior do que o própolis testado, estando de acordo com Eick et al. (2014), que observaram que uma porcentagem notável de células mortas foi encontrada após o pré-tratamento com 1,5 mg de HC em comparação com o controle (sem tratamento), também em PDFL. O potencial de NAC na atenuação da citotoxicidade de vários

biomateriais foi demonstrado utilizando fibroblastos e osteoblastos (Schweikhl et al., 2007). Minamikawa et al. (2010), verificaram que NAC possui um grande potencial quanto a redução da citotoxicidade de ionômeros de vidro modificados por resina (IVMR), quando da análise da viabilidade celular e da apoptose. Os resultados dados pela citometria de fluxo mostraram que a porcentagem de células viáveis da polpa, 24 horas após a semeadura, foi de 46,7% em IVMR não tratado, enquanto aumentou para 73,3% quando suplementado com NAC 25 mM.

Estudos *in vitro* apresentaram resultados conflitantes em relação ao pH alcalino do meio e a produção de ROS. Yeung et al. (2007) verificaram que o HC pode induzir a produção de ROS em ambientes de pH alcalinos, gerando ROS imediatamente após a medicação intra-canal e após 7 e 14 dias de uso da mesma, quando em combinação com a clorexidina. Por outro lado, Eid et al. (2014) encontraram uma diminuição na produção de ROS quando do contato de cimentos endodônticos a base de HC com células de odontoblastos derivadas da papila apical de ratos (MDPC-23) e destacaram que a avaliação da formação intracelular de ROS fornece outra perspectiva para a compreensão das respostas celulares aos materiais de teste. No presente estudo, tanto o HC como NAC produziram ROS em quantidades mínimas, diferente do LPS, que produziu uma grande quantidade, quando comparado aos grupos controle negativo (meio + células) e também ao grupo controle negativo do teste, proposto pelo fabricante. NAC e HC foram efetivos em diminuir o potencial do LPS em estimular a geração de ROS, porém acreditamos que o resultado do HC possa ser controverso, da mesma forma que ocorreu no teste de XTT, com provável precipitação do HC e interferência nos resultados.

As espécies reativas de oxigênio são um subproduto natural do metabolismo do oxigênio e desempenham um papel importante na sinalização, na proliferação e na sobrevivência da célula (Schweikhl et al., 2007). A geração

de ROS ocorre em equilíbrio com inúmeros captadores de ROS, incluindo enzimas, pequenas moléculas, como vitamina C e glutathiona, envolvidas na manutenção da homeostase redox (Zafarulhah et al., 2003; Sadowska et al., 2007). A produção excessiva de ROS, baixos níveis de antioxidantes ou a inibição de enzimas antioxidantes, causam estresse oxidativo e podem ocasionar danos indiscriminados a macromoléculas biológicas (lipídios, proteínas e DNA) (Schweikhl et al., 2007). Em baixas concentrações, ROS estimulam a proliferação e diferenciação de fibroblastos do ligamento periodontal humano (hPDLFs) em cultura, enquanto que em concentrações mais elevadas, eles podem ter efeitos citotóxicos (Liu et al., 2017). A metilação do DNA, que afeta sua estrutura e, conseqüentemente, o desenvolvimento da célula, pode ser absorvida por células B e células monocíticas via endocitose adsorptiva em um compartimento intracelular acidificado. A acidificação do DNA parece ser um passo necessário para induzir a geração específica de ROS intracelular. Essas ROS, pH dependentes, geram a ativação subsequente do fator kapa (NFkB), mas essas etapas podem ser inibidas pelo antioxidante NAC (Yui et al., 1998). O NF- κ B tem sido considerado uma via de sinalização pró-inflamatória prototípica, em grande parte com base na sua ativação por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , e tem papel na expressão de outros genes pró-inflamatórios, incluindo citoquinas e quimiocinas (Ray et al., 2012).

O uso de testes de genotoxicidade é importante para analisar materiais tóxicos em material genético humano. Huang et al. (2011), avaliaram o HC em células de mamíferos pelo teste do Cometa e observaram que o HC não foi genotóxico nas concentrações avaliadas. Em nosso estudo, não foi possível visualizar os micronúcleos dos grupos com HC, pelo teste MNT, porque o HC se deposita sobre as células, impedindo sua contagem e conseqüente visualização de micronúcleos. Provavelmente ocorreu o mesmo no teste do XTT e, talvez, no teste ROS, com precipitação do HC, impedindo a correta

mensuração e análise celular, o que nos chamou a atenção para, talvez, reduzirmos a concentração do hidróxido de cálcio para a realização de pesquisas futuras. Kurashige et al. (2017), avaliaram o efeito da NAC nos níveis de ROS, quebras de DNA de dupla cadeia (DSB) e micronúcleos (MN) induzidos por radiação interna e externa, usando a linhagem PCCL3, sendo que, quando da radiação interna, os níveis de ROS e DSB aumentaram imediatamente após a adição de ^{131}I e depois diminuíram gradualmente, resultando em níveis muito altos de MN em 24 e 48 horas, mas a administração de NAC prévia a radiação e também pós, suprimiu ROS, DSB e MN. De acordo com o presente estudo, como esperado, no grupo C- houve menor formação de micronúcleos e no grupo LPS, maior (Tabela 1). O grupo NAC apresentou o menor número de micronúcleos, mas não foi estatisticamente diferente do grupo NAC + LPS, o que demonstra a capacidade da NAC em proteger as células do efeito genotóxico do LPS (Figura 2). É possível que a indução de genotoxicidade do LPS esteja ligada à formação de ROS e ao dano oxidativo do DNA (Schweikl et al., 2007).

O LPS induz a produção de citocinas, incluindo o $\text{TNF-}\alpha$, por fibroblastos, macrófagos e outras células que são capazes de estimular a formação e ativação dos osteoclastos e podem promover a diferenciação, fusão, sobrevivência e ativação dos osteoclastos, independentemente da IL-1 e do $\text{TNF-}\alpha$ (Mizutani et al., 2013). Em relação às citocinas avaliadas em nosso estudo, NAC induziu maior expressão de $\text{TNF-}\alpha$, seguido de LPS, mas NAC atenuou a indução causada por LPS melhor que o HC. Da mesma forma, NAC reduziu a expressão de IL- 1β melhor do que HC, e a expressão maior foi encontrada nos grupos HC e NAC. Quanto a IL-6, o grupo NAC foi o que menos induziu a sua expressão, mas quando o LPS estava presente, o HC foi mais efetivo na redução de sua expressão do que NAC. Para a IL-8, NAC conseguiu atenuar significativamente sua expressão; no entanto, quando da

presença de LPS, tanto NAC quanto HC foram capazes de reduzir a expressão desta citocina. Em relação a IL-10, o grupo LPS foi semelhante ao grupo NAC + LPS. Karapinar et al. (2016) investigaram o efeito da NAC comparando-a com o HC em relação a citocinas pró e anti-inflamatórias e observaram que ambos os materiais tiveram um efeito anti-inflamatório pela ação sobre o LPS. A fração ativa da NAC é o sítio tiol (-SH), que desempenha um papel na eliminação e destruição de radicais livres do grupo dissulfeto de proteínas intermoleculares ou intramoleculares, como o LPS (Sevier, Kaiser, 2002). NAC reage com os grupos SH, através das ligações com os grupos dissulfeto do LPS, sendo capaz de interromper as ligações entre dissulfeto e enzimas constituintes do LPS (Quah et al., 2012). Em nosso estudo, quando da presença do LPS, NAC atenuou a produção de citocinas, provavelmente pela destruição de suas enzimas, o que a tornou menos agressiva para os fibroblastos testados.

A glutathiona é a molécula principal no sistema antioxidante intracelular (Schweikhl et al., 2007). NAC exerce atividade anti-inflamatória através da sua capacidade de inibir a expressão e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias (Sadowska et al., 2007). Nas células do músculo liso das vias aéreas humanas, NAC diminuiu a expressão induzida por IL-1 β e os efeitos de produção de NAC no patógeno endodôntico 323 da eotaxina e proteína quimiotática monocitária-1 (Lappas et al., 2003). Observou-se também que NAC inibiu a regulação da CD11b induzida por IL-8 no sangue total humano, pois neutraliza diretamente ROS ao doar um átomo de hidrogênio do seu grupo tiol (Ancha et al., 2008). A adição de NAC à cultura demonstrou inibir o dimetacrilato de trietileno glicol e a morte celular induzida por ele, em fibroblastos e células de polpa dentária, conforme Kojima et al., 2008.

De acordo com o presente estudo, NAC foi capaz de preservar a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal na presença de LPS e

também de reduzir a produção de ROS. Além disso, sob o estímulo do LPS, NAC foi capaz de atenuar a expressão de TNF- α e IL-1 β .

REFERÊNCIAS*

- Ancha HR, Kurella RR, McKimney CC, Lightfoot S, Harty RF. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2009;54(4):758-66.
- Baek KJ, Choi Y, Ji S. Gingival fibroblasts from periodontitis patients exhibit inflammatory characteristics in vitro. *Arch Oral Biol*. 2013;58:1282-92.
- Baldini PM, De Vito P, Martino A, Fraziano M, Grimaldi C, Luly P, et al. Differential sensitivity of human monocytes and macrophages to ANP: a role of intracellular pH on reactive oxygen species production through the phospholipase involvement. *J Leukoc Biol*. 2003;73:502-10.
- Burns MR, Jenkins SA, Wood SJ, Miller K, David SA. Structure-activity relationships in lipopolysaccharide neutralizers: design, synthesis, and biological evaluation of a 540-membered amphipathic bisamide library. *J Comb Chem*. 2006;8:32-43.
- Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Sculean A, Gruber R. Sterile-filtered saliva is a strong inducer of IL-6 and IL-8 in oral fibroblasts. *Clin Oral Invest*. 2015;19:385-99.
- Dammaschke T, Jung N, Harks I, Schafer E. Effect of different root canal medicaments on the elimination of *Enterococcus faecalis* ex vivo. *Eur J Dent*. 2013;7(4):442-8.
- Demiralay R, Gursan N, Erdem H. Regulation of sepsis-induced apoptosis of pulmonary cells by posttreatment of erdosteine and N-acetylcysteine. *Toxicology*. 2006;228:151-61.
- Eick S, Strugar T, Miron RJ, Sculean A. In vitro activity of oily calcium hydroxide suspension on microorganisms as well as on human alveolar osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts. *BMC Oral Health*. 2014;14:9.
- Grossmann L, Luc L, Lecqueur V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death and Differentiation*. 2004;11:953-61.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htm

Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. In vitro biocompatibility and oxidative stress profile of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod.* 2014;40(2):255-60.

Huang Y, Fenech M, Shi Q. Micronucleus formation detected by live-cell imaging. *Mutagenesis.* 2011;26:133–8.

Jahromi MZ, Ranjbarian P, Shiravi S. Citotoxicity evaluation of Iranian propolis and calcium hydroxide on dental pulp fibroblasts. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect.* 2014;8(3):130-3.

Karapinar SP, Ulum YZA, Ozcelik B, Buzoglu DH, Ceythan D, Peynircioglu BB, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol.* 2016;68:48-54.

Kitikuson P, Srisuwan T. Attachment ability of human apical papilla cells to root dentin surfaces treated with either 3Mix or calcium hydroxide. *J Endod.* 2016;42(1):89-94.

Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, Tsukimura N, Kubo K, Jewett A, et al. Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA) based dental resin supplemented with N-acetylcysteine (NAC). *Dent Mat.* 2008;24:1686–93.

Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. N-Acetyl-L-cysteine protects thyroid cells against DNA damage induced by external and internal irradiation. *Radiat Environ Biophys.* 2017;56(4):405-12.

Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-Acetylcysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and nuclear factor-kappaB deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(4):1723-9.

Lin X, Kong J, Wu Q, Yang Y, Ji P. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on expression of IL-1 β and TNF- α in synovial fibroblasts from temporomandibular joint exposed to lipopolysaccharide. *Hindawi.* 2015;1-11.

Liu L, Huang R, Yang R, Wei X. OCT4B1 regulates the cellular stress response of human dental pulp cells with inflammation. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2756891.

Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*. 2001;28:181-8.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010;36:1766-9.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. PH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004;30:218-9.

Mizutani H, Ishihara Y, Izawa A, Takeda HO, Kamiya OU, Kikuchi TK, Gotou H, et al. Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* upregulates inflammatory cytokines, prostaglandin E2 synthesis and osteoclast formation in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Periodontol Res*. 2013;48:748-56.

Midena RZ, Garcia RB, Cavenago BC, Marciano MA, Minotti PG, Ordinola-Zapata R, et al. Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. *J Appl Oral Sci*. 2015 Oct;23(5):508-14.

Minamikawa H, Yamada M, Iwasa F, Ueno T, Deyama Y, Suzuki K, et al. Amino acid derivated-mediated detoxification and functionalization of dual cure dental restorative material for dental pulp cell mineralization. *Biomaterials*. 2010;31(28):7213-25

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44(8):697-730.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Med*. 2004;15:348-81.

Nasser MW, Raghuwanshi SK, Grant DJ, Jala VR, Rajarathnam K, Richardson RM. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *J Immunol*. 2009;183:3425-32.

Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScue: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;25(7):373.

- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, García-Godoy F, Moldauer BI, Gagliardi Minotti P, Tercília Grizzo L, et al. The effect of radiopacifiers agents on pH, calcium release, radiopacity, and antimicrobial properties of different calcium hydroxide dressings. *Microsc Res Tech.* 2015;78(7):620-5
- Quah SY, Wu S, Lui JN, Chee Peng S, Kai ST. N-Acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012;38(1):81-5.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012;24:981–90.
- Sadowska AM, Manuel-Y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: discordant in vitro and in vivo dose-effect: a review. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20(1):9-22.
- Scelza MF, Daniel RL, Santos EM, Jaeger MM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *J Endod.* 2001;27(12):741-3.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191-212.
- Schuurs AH, Gruythuysen RJ, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16(6):240–50.
- Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2007;23:688-95.
- Schweikl H, Widbiller M, Krifka S, Klement J, Petzel, Bolay C, et al. Interaction between LPS and a dental resin monomer on cell viability in mouse macrophages. *Dent Mater.* 2016;1492-503.
- Senne MI, Lemons N, Fidel SR, Fidel RAS. Evaluation of the cytotoxicity of three root canal sealers used in obturation of radicular canals system. *RSBO.* 2009;6(1):71-6.
- Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:836-47.

Shrestha A, Friedman S, Torneck CD, Kishen A. Bioactivity of photoactivated functionalized nanoparticles assessed in lipopolysaccharide-contaminated root canals in vivo. *J Endod.* 2017 Nov 15.pii: S0099-2399(17)30965-2. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.021. [Epub ahead of print]

Shrivastava, Rai VK, Kumar A, Sinha S, Tripathi P, Gupta K, et al. An in vitro comparison of endodontic medicaments propolis and calcium hydroxide alone and in combination with ciprofloxacin and moxifloxacin against *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(5):394-9.

Sousa EL, Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Gomes BP. Macrophage cell activation with acute apical abscess contents determined by interleukin-1 Beta and tumor necrosis factor alpha production. *J Endod.* 2014;40(11):1752-7.

Spagnuolo G, Desiderio C, Riviaccio V, Amato M, Rosseti DV, D'Anto V, et al. In vitro cellular detoxification of triethylene glycol dimethacrylate by adduct formation with N-Acetylcysteine. *Dent Mat.* 2013;29(8):e153-60.

Stylou M, Reich FX, Stylou P, Urcan E, Rothmund L, Hickel R, et al. Dental composite components induce DNA-damage and altered nuclear morphology in gingiva fibroblasts. *Dent Mat* 2015; 31(11):1335-44.

Torun OZ, Torun D, Demirkaya K, Yavuz ST, Elci MP, Sarper M, et al. Effects of iRoot BP and white mineral trioxide aggregate on cell viability and the expression of genes associated with mineralization. *Int Endod J.* 2015 Oct;48(10):986-93.

Yamada M, Kojima N, Att W, Sato N, Iwasa F, Ogawa T, et al. N-Acetylcysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental-resin extract. *Redox Rep.* 2009;14(22):13-22.

Yeung SY, Huang CS, Chan CP. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J.* 2007;40(11):837-44.

Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM, et al. CpG motifs in bacterial DNA activates leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol.* 1998;160:4755–61.

Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Amad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine action. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20.

Zhang XY, Hayasaka S, Hayasaka Y, Cui HS, Chi ZL. Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced uveitis in rats. *Jpn J Ophthalmol.* 2007;51(1):14-20.

APÊNDICE A – Detalhamento da metodologia

PROTÓCOLOS

a. XTT

Após 48 horas de contato das células com os tratamentos propostos, a viabilidade celular foi determinada pelo teste XTT. O teste baseia-se na habilidade de enzimas mitocondriais, da atividade metabólica de células ativas, em reduzir moléculas de 2,3 - bis (2 - methoxy - 4 - nitro - 5 - sulphophenyl) - 2H - tetrazolium - 5- carboxanilide (XTT) em sal solúvel formazan, de cor alaranjada, detectável por uma absorvância de 490 nm. A solução de XTT foi preparada diluindo-se 10 mg do pó de XTT em 10 mL de PBS. Ao XTT preparado, foram acrescentados PBS e Menadiona. Para cada 40 µL do XTT preparado colocou-se 158 µL de PBS e 2 µL de menadiona (pó + acetona). Como esta solução é sensível à luz, a mesma foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultura foi removido dos poços e foram adicionados 200 µL da solução de XTT preparado por poço. Cada placa foi envolvida em papel alumínio e colocada em estufa por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. Ao término deste período, as placas foram levadas ao espectrofotômetro (Asys Hitech GmbH, Áustria), previamente programado, para quantificação da inibição enzimática, em comprimento de onda de 490 nm (Figura 1). O teste foi realizado em triplicata para validação dos resultados. Os valores da absorvância dados pelo espectrofotômetro foram normalizados em relação ao controle negativo e os valores resultantes das médias da triplicata para cada grupo foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e teste Dunn (P<.05).

b. ROS

Em cada poço da placa de 6 poços foram semeadas 3×10^5 células (PDFL) em 2,5 mL de DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina, seguido de incubação durante 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os tratamentos foram aplicados e as células foram incubadas durante 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, 1 mL de meio de cultura com os tratamentos foi transferido para eppendorfs. Os níveis de ROS intracelulares foram mensurados utilizando kit ROS (Life Technologies, USA). Os controles positivos (TBHP) e negativos (NAC) do teste foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante. O Reagente de Detecção CellROX® foi adicionado a uma concentração final de 500-1000 nM; incubado durante 30-60 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Durante os 15 minutos finais do teste, adicionou-se 1 µL da solução SYTOX® Dead Cell Stain por mL de suspensão celular. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo, em filtro vermelho, a 639 nm. O teste foi feito em triplicata e as diferenças entre os valores médios de cada grupo foram analisadas estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos, com significância de $P < .05$.

c. ELISA

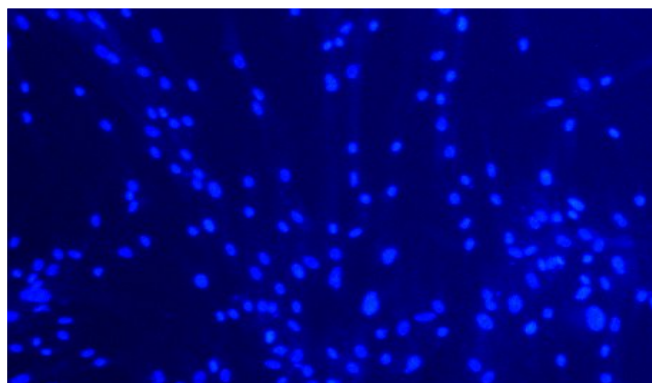
As quantidades de IL-6, IL-8, IL-1, IL-1β e TNF-α liberadas no meio de cultura, após 48 horas de contato dos tratamentos propostos com as células, foram mensuradas usando o ELISA-kit (Human Quantikine, R&D, Minneapolis, MN, EUA). As placas foram sensibilizadas com 100 µL de PBS e anticorpo de captura específico para cada citocina e para o levantamento da curva padrão, cobertas com filme plástico e mantidas até o dia seguinte. No segundo dia de

teste, os poços foram lavados por 3 vezes com 300 μ L de solução tampão e batidas em guardanapo para completa secagem dos poços. Adicionou-se 300 μ L da solução de bloqueio (reagente diluente) na proporção de 100 mL de PBS para 1 g de BSA, e as placas mantidas em repouso por 1 hora. Enquanto isso, as curvas padrão para cada citocina avaliada foram preparadas. Foram colocados 600 μ L do reagente diluente nos primeiros eppendorfs de cada padrão e 300 μ L nos demais. O anticorpo de captura foi colocado no primeiro eppendorf de cada grupo, sendo sua quantidade calculada de acordo com as instruções do fabricante. A diluição foi realizada transferindo 300 μ L do primeiro eppendorf para o segundo, e assim sucessivamente. Decorrida 1 hora de repouso, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com 300 μ L de solução de lavagem e secas através de batidas no guardanapo. Então, foram adicionados 100 μ L do padrão nas duas primeiras colunas da placa e 100 μ L das amostras nos demais poços, ambos em duplicata. As placas permaneceram vedadas durante 2 horas. Realizou-se, então, a lavagem por 3 vezes com 300 μ L de solução de lavagem e secagem das placas, para então serem adicionados 100 μ L do anticorpo de detecção em cada poço, mantendo-se assim por 2 horas. Seguiu-se a lavagem e secagem das placas e adição de 100 μ L / poço de estreptavidina. As placas foram cobertas com papel alumínio e, após 20 minutos, foram acrescentados 100 μ L da solução A + B. As placas foram novamente cobertas com papel alumínio, e após 20 minutos de reação adicionou-se 50 μ L de solução stop (ácido sulfúrico 2N) em cada poço. Seguiu-se à leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram normalizados com a solução padrão e cada valor densitométrico, expresso como média \pm desvio padrão, foi obtido a partir de dois experimentos independentes.

d. MICRONÚCLEO (MNT)

Foram semeadas 1×10^5 de células PDFL em cada poço da placa de 24 poços, em 2 mL de DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina durante 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. As culturas de células foram expostas aos diferentes tratamentos, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Então, solução salina de tampão de fosfato (PBS, Cultilab) e solução Fluoroshield com DAPI (Sigma-Aldrich) foram adicionadas aos poços, os quais foram fotografados com câmara digital (Sony F828 digital, CyberShot, 8,0 megapixéis) acoplada a microscópio de luz invertido. Pelo menos 10 fotos por poço foram realizadas e o número de micronúcleos foi determinado para cada 1000 células/poço, com auxílio do programa Image J. Foram identificados como micronúcleos, estruturas de DNA contidas no citoplasma separadas do núcleo principal, com uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal (Figura 1). As diferenças entre os valores médios foram analisadas estatisticamente, através do teste de Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos, com significância de $P < .05$.

Figura 1. Imagens analisadas pelo software Image J para análise do micronúcleo e contagem das células



APÊNDICE B – Resultados do Teste do Micronúcleo (MNT)

Foi realizada a contagem dos micronúcleos a cada 1000 células, sendo 12 poços por grupo. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Para cada poço, foram realizadas 10 imagens. É possível verificar na Figura 2 que o grupo LPS foi o mais genotóxico ($48,17 \pm 0,13$), quando comparado com o grupo Controle negativo (C-) ($19,67 \pm 4,13$). NAC não apresentou efeito genotóxico significativo ($30 \pm 4,34$) e não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NAC + LPS ($32 \pm 6,36$). Não foi possível realizar a contagem dos micronúcleos nos grupos HC e HC + LPS, devido à deposição do pó do hidróxido de cálcio sobre as células (Figura 3).

Figura 2. Indução de micronúcleo em células PDFL após exposição aos tratamentos

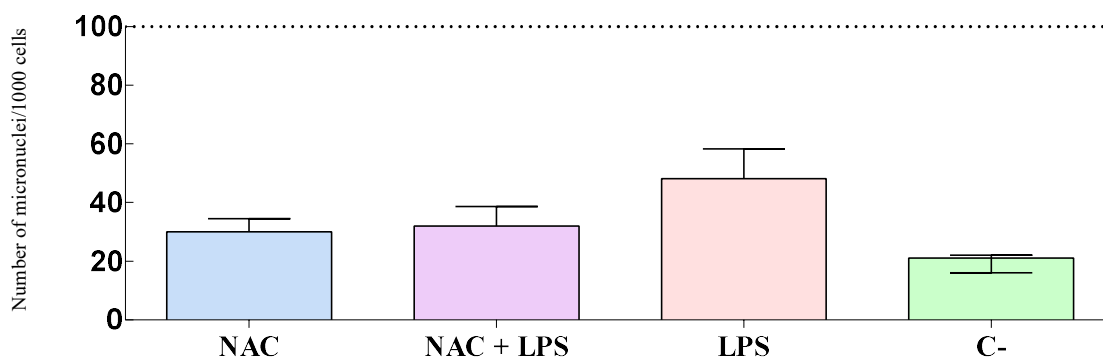
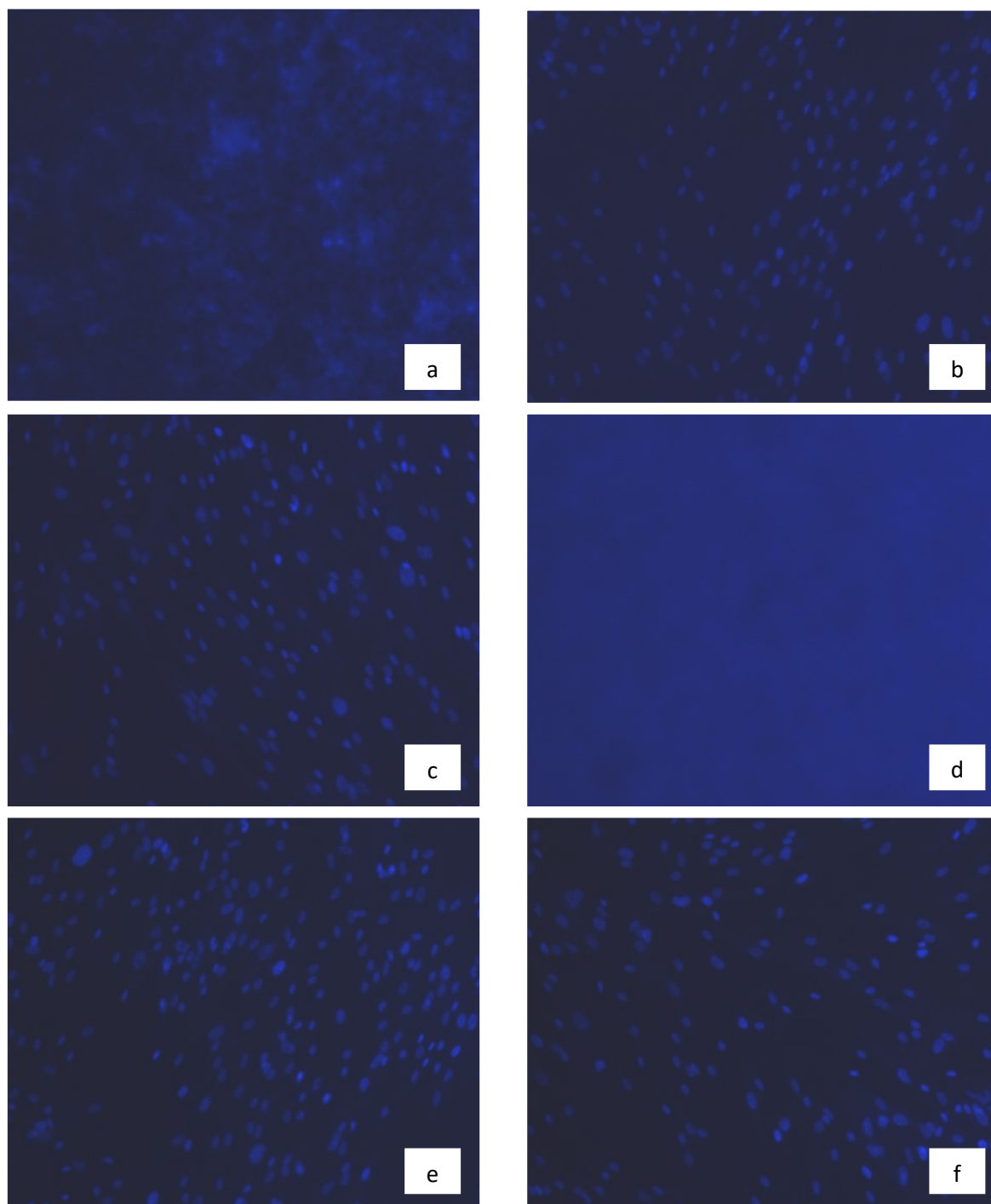


Figura 3. Resultado do teste do Micronúcleo



Legenda: Imagens da imunofluorescência dos grupos HC (a), NAC (b), LPS (c), HC + LPS (d), NAC + LPS (e), Controle negativo (f).

TABELA 1. Indução de micronúcleos em células PDFL após exposição aos tratamentos

Grupos	Média	DP	Mínimo	Máximo
HC	*	*	*	*
NAC	30	4.34	24	35
LPS	48.17	10.13	41	67
HC + LPS	*	*	*	*
NAC + LPS	32	6.36	24	38
C-	19.67	4.13	13	25

HC, Hidróxido de cálcio; NAC, N-Acetilcisteína; LPS, Lipopolissacarídeo; HC + LPS, Hidróxido de cálcio + Lipopolissacarídeo; NAC + LPS, N-Acetilcisteína + Lipopolissacarídeo; C-, Controle negativo. *Não foi possível visualizar e realizar a contagem dos micronúcleos, devido à deposição do Hidróxido de cálcio sobre as células.

ANEXO A – Comprovante de artigo enviado para publicação

From: The Journal of Endodontics <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Date: January 18, 2018 at 10:07:46 PM EST

To: henrique@ict.unesp.br

Subject: Submission Confirmation for IN VITRO ANALYSIS OF N-ACETYLCYSTEINE IN FIBROBLASTS STIMULATED BY BACTERIAL LPS

Reply-To: The Journal of Endodontics <hargreaves@uthscsa.edu>

Dear Dr. Camargo,

Your submission entitled "IN VITRO ANALYSIS OF N-ACETYLCYSTEINE IN FIBROBLASTS STIMULATED BY BACTERIAL LPS" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <https://ees.elsevier.com/joe/>

Your username is: henrique@ict.unesp.br

If you need to retrieve password details,
please go to: http://ees.elsevier.com/joe/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics