

TATIANA ROCHA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO TEMPO APÓS MANIPULAÇÃO NA
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE DIFERENTES
CIMENTOS ENDODÔNTICOS**



2011

TATIANA ROCHA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DO TEMPO APÓS MANIPULAÇÃO NA CITOTOXICIDADE
E GENOTOXICIDADE DE DIFERENTES CIMENTOS ENDODÔNTICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade em Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

São José dos Campos,
2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
 Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
 Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
 Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

- O4i Oliveira, Tatiana Rocha de.
 Influência do tempo após manipulação na citotoxicidade e
 genotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos / Tatiana Rocha de
 Oliveira. - São José dos Campos: [s.n.], 2011.
 108. f: il.
- Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de
 Odontologia de São Jose dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista,
 2011.
 Orientador: Prof. Carlos Henrique Ribeiro Camargo
1. Cimentos endodônticos. 2. Genotoxicidade. 3. Citotoxicidade. 4. MTT.
 5. Teste Cometa. I. Camargo, Carlos Henrique Ribeiro. II. Faculdade de
 Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.
 III. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. IV. Título

tD 24

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
 Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 07 de Julho de 2011 .

Assinatura:

E-mail: tate_tate1@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Cácio de Moura Netto

Faculdade de Odontologia de São Paulo
UNIP - Universidade Paulista

Profa. Titular Marcia Carneiro Valera

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 01 de agosto de 2011

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor

Aquele que Foi, que É e que sempre Será.

Aquele que nada posso fazer, atingir, viver sem Ele.

Ele vive em mim e comigo, sempre como meu melhor amigo e meu Pai
querido.

Se hoje sou o que sou, foi porque o Senhor me amou primeiro e colocou
pessoas abençoadas para o meu cuidado.

Obrigada por nunca desistir de mim

À minha mãe tão amada, **Valdíná Matos Rocha de Oliveira** que há
tão pouco foi morar no céu...

Meu eterno amor e gratidão por sempre tê-la ao meu lado, em tudo você
sempre esteve ao meu lado, como eu gostaria que estivesse aqui para que eu
pudesse te orgulhar, como forma de um pequeno presente para agradecer pelo
seu amor ilimitado por mim.

Amo você!

Maximiano José de Oliveira, o pai incomparável que o meu Paizinho do
céu me deu e o levou. Devo e dedico ao senhor a formação do meu caráter, a
minha força, formação profissional, que recebi de ti de forma doce e
extremamente amorosa.

Saudade ... Amo você!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus para sempre amados pais

Obrigada pelo amor que conheci e senti de vocês – INCONDICIONAL, amor que superou barreiras, dificuldades para fazer de mim o melhor de vocês.

Às minhas irmãs Bel e Mara

Bel sempre tão calma e tão serena, guardo no meu coração o amor por você com toda a delicadeza que você é!

Mara, meu exemplo de vida, minha irmã-mãe, obrigada por toda garra e dedicação na qual eu sempre me espelhei, obrigada pelo seu profundo amor gratuito por mim.

Amo vocês!

Ao meu Amado Diego

Homem corajoso, ousado e usado que o Senhor colocou na minha vida para cuidar de mim e eu dele. Não teria como falar em palavras o significado do amor que sinto por você. Obrigada por sempre me encorajar nos estudos, na pesquisa, por me amar, respeitar e pelo seu cuidado. Amo você, isso não é novidade! Tiriri!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador:

Ique, obrigada por nunca desistir de mim, sempre acreditando que tudo iria dar certo! Obrigada por me ensinar a pesquisar, mais do que orientador muitas vezes você foi o meu amigo! Que Deus te abençoe sempre.

Samira,

Minha querida Samirinha, minha amiga, minha “Co orientadora” dos momentos loucos de laboratório e conversas pelo skype...

Obrigada pelas longas conversas, cheias de risos e alegria, pelo ensinamento e soluções imediatas. Você é um presente de Deus!

À professora Marcia,

Sempre com o sorriso no rosto que me trás paz ao coração.

Meu exemplo de superação, profissionalismo e amor.

Agradeço à Deus, por ter colocado pessoas como a Senhora para me ensinar não só a Endodontia, mas sobre as coisas que a vida também nos ensina.

Tenho um carinho especial pela senhora de aluna-filha-amiga . Obrigada pela sua vida!

Aos meus familiares:

Aos meus cunhados Sidnei, Glauco, agradeço à Deus pela vida de vocês na nossa família, pois vocês vieram para acrescentar e muito, nos momentos de felicidade e de dor vocês sempre se mostraram como irmãos para mim. Obrigada!

Aos meus sobrinhos, Giovana, Bruno, Giuliano, obrigada por deixarem minha vida mais colorida!!

Minha família : Zélia, Lazaro, Allan, obrigada por sempre acreditarem em mim, me acolherem, me amarem, nunca me negando nada. Amo vocês!!

Tio Lucas, você é o meu exemplo de inteligência, obrigada pelo seu cuidado comigo desde de pequena, hoje estamos longe, mas saiba que isso não alegra o meu coração, amo você!

Aos meus amados tios e primos, obrigada por todo apoio, carinho, estímulo e sempre estarem presentes não deixando nunca que nossa família morra, minha eterna gratidão pela vida de Tia Léo e Tio João, Tia Edi e Tio Fábio, Tio Matino e Tia Dorinha, Tia Nalvinha e Tio Janga, Tio Fiori e Tia Odinalva, Tio Nengo!!

Duda, você mora no meu coração, meu primo irmão, amo você!

Priscila, Críscia, Lilian, Suelem amigas verdadeira, verdadeiramente para sempre, amo muito vocês!

Aos meus amigos do Mestrado:

Ana Claudia, Claudia, Mariana, Nadia, Patricia, Rafinha, Lu, Rodrigo.

Obrigada por todos os momentos juntos de grande alegria, muitas vezes tensões, mas sempre compartilhando nossos anseios com camaradagem.

Que Deus abençoe muito a vida de vocês!

Alê, obrigada por todo o tempo de aprendizado que você nos proporcionou, nos ensinando como engatinhar no laboratório de células, creio na sua capacidade e tenho certeza q você terá muito sucesso. Obrigada por sua amizade!

Meninas, de muitas amigas Deus as tornam irmãs:

Gleyce, minha duplinha do coração!

Eu não tenho palavras que possam expressar a minha gratidão por você e toda a sua família, você caminhou comigo e hoje você está vencendo comigo, não chegaria ao fim se não fosse pela sua lealdade e amizade.

Amiga é pouco, irmã cabe melhor aqui!

Agradeço à Deus pelo presente que ganhei durante esse mestrado :

Você! Amo você!

Flavinha, amiga de todas as horas!

No momento difícil, de desespero, de alegria , de jogar conversa fora, de tomar cafezinho, de fazer as unhas você sempre esteve, sempre tornando esses momentos leves e mais agradáveis. Obrigada por ser minha amiga quem posso confiar! Agradeço à Deus pela sua vida na minha vida!

Michelle,

Minha amiga desde a graduação e até hoje tão presente na minha vida, eu louvo à Deus pela sua vida na minha vida, por todos os momentos gostosos que compartilhamos, sempre com muita alegria e amizade verdadeira, amo você amiga!

Dri e Lilian

Nós nos conhecemos há tão pouco tempo, mas plantamos uma amizade tão verdadeira que me agrada estar perto de vocês, sempre com palavras encorajadoras e sempre com as respostas às minhas dúvidas profissionais e da vida. Obrigada meninas por deixarem a minha vida mais doce!

Sylvia, doce e adorável Sylvitia...como não ficar tranqüila ao seu lado?

Eu gosto de estar ao seu lado, me sinto em paz, você é o meu exemplo de superação, carinho e bondade. Obrigada por caminhar comigo e

compartilhar do meu crescimento sempre com tanto entusiasmo!

Obrigada por sua Vida, você sempre estará no meu coração!

Poly, perto de você eu sinto o afago, sinto que você se preocupa comigo também, obrigada pela sua amizade verdadeira que não espera nada em troca, ao contrario, você mais dá do que recebe. Que Deus te abençoe!

Aos professores Claudio, Ana Paula, Márcia Maciel, Renato, obrigada por me ensinarem Endodontia e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada pelo apoio e carinho.

À FAPESP, pelo apoio à pesquisa e concessão de bolsa de estudo.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3 PROPOSIÇÃO.....	35
4 MATERIAL E MÉTODO.....	36
4.1 Cultivo das células	36
4.1.1 Descongelamento	37
4.1.2 Troca de Meio	38
4.1.3 Subcultura	40
4.1.4 Contagem de células	41
4.2 Plaqueamento	42
4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular	43
4.4 Preparação dos extratos originais e diluição.....	44
4.5 Ensaio de Citotoxicidade	45
4.6 Ensaio de Genotoxicidade	46
4.7 Análise Estatística	46
5 RESULTADOS	58
5.1 Teste de citotoxicidade	
5.2 Teste Cometa	58
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO	88
8 REFERÊNCIAS	89
 ANEXO	124

Oliveira TR. Influência do tempo após manipulação na citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de quatro cimentos endodônticos: AH Plus (Dentsply De Trey, Alemanha); Endo Rez (Ultradent, USA); RoekoSeal (Coltene Whaledent, Alemanha) e o Cimento experimental à base de óleo-resina de Copaíba (Brasil). A avaliação foi realizada em três diferentes tempos após manipulação: 0h, 12h e 24h. Os espécimes foram preparados, deixados por 12 e 24h em estufa (37 °C a 100% umidade a 5% de CO₂) e colocados em contato com meio de cultura (82,4 mm² superfície/ml) por 24 h. Células V79 foram expostas à diferentes diluições dos cimentos por 24 h e a viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT em espectrofotômetro. Para o teste de genotoxicidade os extratos que apresentaram concentrações de citototoxicidade média foram selecionados para o teste cometa após 24 h de exposição. A viabilidade celular e o dano ao DNA foram comparados aos grupos controles e analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn (p<0,05). No teste de citotoxicidade, todos os cimentos apresentaram diferença significativa em relação ao controle, com exceção do RoekoSeal. A viabilidade celular de acordo com cimento utilizado pode ser classificada da maior toxicidade para a menor seguindo: EndoREZ > AH Plus > Copaíba > RoekoSeal. O dano ao DNA verificado no teste cometa pode ser classificado do maior para o menor em: EndoREZ > RoekoSeal > AH Plus > Copaíba. Conclui-se que o cimento EndoREZ é citotóxico e genotóxico nos tempos e diluições estudadas.

Palavras-chave: Cimentos endodônticos. Genotoxicidade. Citotoxicidade. MTT. Teste Cometa.

Oliveira TR. Influence of time after manipulation on cytotoxicity and genotoxicity of different root canal sealers [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2011.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate cytotoxicity and the genotoxicity of four different root canal sealers, AH Plus (Dentsply De Trey, Germany); Endo REZ (Ultradent, USA); RoekoSeal (Coltene Whaledent, Germany) and the experimental root canal sealer based on Copaiba oil-resin sealer (Brazil). The evaluation of the materials was performed after three different times of manipulation: 0h, 12h and 24h. The specimens were prepared, incubated in a humidified incubator (37°C with 5% CO₂ in air for 12h and 24h) and then put in contact with the culture medium (82,4 mm² surface/ml) during 24h. V79 cells were exposed at different dilutions of the sealers during 24h and the cell's viability was measured by the MTT test in a spectrophotometer. For the genotoxicity tests, the extracts from the concentrations with medium cytotoxicity were selected for the comet assay after 24h of exposure. The cellular viability and the DNA damage were compared with the control groups and analyzed by the tests of Kruskal-Wallis and Dunn ($p < 0,05$). The cytotoxicity test showed that all root canal sealers showed a statistically significant difference when compared with the control group, with the exception of the RoekoSeal. The ranking of cell's viability according with sealer utilized from the most to the least toxic material was: EndoRez > AH Plus > Copaíba > RoekoSeal. The ranking of DNA damage verified at the comet assay, from the most to the least was: EndoREZ > RoekoSeal > AH Plus > Copaíba. It was conclude that, at the times and dilutions studied, the EndoREZ sealer is genotoxic and citotoxic.

Keywords: Endodontic sealers. Cytotoxicity. Genotoxicity. Comet assay. MTT.

1. INTRODUÇÃO

Para o sucesso do tratamento dos canais radiculares é necessário que todas etapas deste tratamento sejam vistas com a mesma atenção e importância, uma vez que, são considerados procedimentos operatórios interdependentes. Mesmo assim, tende-se a dar grande ênfase à fase da obturação dos canais radiculares, visto que o êxito final do tratamento está condicionado a esta etapa. “De nada adiantarão os cuidados de assepsia e um processo químico-mecânico cuidadoso se a obturação for inadequada” (Bevilacqua et al., 1962; Leonardo et al., 2008).

Sendo assim, o sucesso na obturação dos canais radiculares está intimamente relacionado, entre outros fatores, na escolha do material obturador e técnica a ser empregada. Dentre as características ideais a serem alcançadas, o material de escolha deve ser inerte, permitir o selamento dos canais radiculares e ainda se possível, favorecer o processo de reparo apical e periapical (Leonardo et al., 2008). Nos dias atuais, cada vez mais o vedamento coronário é considerado tão importante quanto a obturação, passando a fazer parte desta etapa, para que o tratamento não fracasse pela contaminação do sistema de canais radiculares. Devido a isto a busca por cimentos que impeçam esta contaminação vem mostrando uma tendência a cimentos resinosos à base de resina epóxica ou metacrilatos, contudo, os resultados de pesquisas mostram que estes cimentos não os mais biocompatíveis (Huang et al., 2002; Schweikl et al., 1998).

Mesmo com os avanços técnicos de instrumentação e obturação é inevitável o contato do material obturador com os tecidos vivos adjacentes ao canal, despertando assim estudos mais aprofundados quanto as características biológicas dos cimentos (Bouillaguet et al., 2004), uma vez que estes permanecem em contato com os tecidos apicais por um longo período, podendo até mesmo causar reações inflamatórias

persistentes, não permitindo a hemostasia tecidual na região apical. (Williams,1990; Geurtsen,1997; Huang et al., 2002). Tais substâncias, como também o produto da degradação dos materiais obturadores dos canais radiculares chegam aos tecidos apicais (ligamento periodontal, osso alveolar) por meio de numerosas conexões, túbulos dentinários, canais acessórios, laterais e forame apical (Al-Hiyasat et al., 2010).

Nesta busca, a tendência é de que cada vez mais os cimentos apresentem características como: boa tolerância tecidual, capacidade de ser reabsorvido no periápice em caso de extravasamento, estimular ou permitir a deposição de tecido mineralizado na região do ápice, ser de fácil inserção, ser plástico no momento da inserção tornando-se sólido posteriormente, possuir bom tempo de trabalho, proporcionar um bom selamento, não sofrer contrações, não ser permeável, possuir boa viscosidade e aderência, não possuir solubilidade dentro do canal radicular, possuir pH próximo ao neutro, aliando assim propriedades físicas, químicas e biológicas (Leonardo et al., 2008).

Clinicamente, vários tipos de materiais são utilizados para o preenchimento dos canais radiculares. Estes materiais possuem bases em várias fórmulas, mas geralmente eles estão divididos pelos seus principais componentes, contudo, muitas vezes é uma tarefa difícil classificar os cimentos por sua composição pois há muitas associações de bases. Os cimentos mais conhecidos são à base de óxido de zinco e eugenol, resina epóxi, ionômero de vidro e hidróxido de cálcio (Al-Hiyasat et al., 2010; Hume, 1986, Schmalz et al., 2000; Schwarze et al., 2002; Hovland & Dumsha, 1985; Huang et al., 2002; Willershausen et al., 2000). Atualmente, os cimentos resinosos tem maior destaque na clínica endodôntica, porém, apesar destes ter alcançando grande popularidade, eles são capazes de promover citotoxicidade e mutagenicidade (Schweikl et al., 1998; Huang et al., 2002). Também tem sido desenvolvido materiais à base de silicone e estudos mostram resultados promissores pelo fato de serem estáveis e inertes aos tecidos apicais (Wu et al., 2002; Huuonen et al., 2003). Porém,

suas propriedades físicas como adesividade e microdureza não são ainda conhecidas e necessitam também de mais estudos.

Pesquisas voltadas para a utilização de materiais fitoterápicos têm mostrado melhores respostas de biocompatibilidade e conseqüentemente, menor citotoxicidade destes materiais. Na Endodontia, materiais obturadores contendo fitoterápicos vem sendo desenvolvidos; como exemplo um cimento à base do óleo polímero da mamona, já bastante comprovado quanto as suas propriedades físico químicas e biológicas (Camargo et al., 2009a) e também um derivado do óleo de Copaíba que é um produto extraído de várias espécies do gênero *Copaífera* (Veiga Junior , Pinto, 2002). Há muito tempo utilizado pelos índios para o tratamento de feridas, este óleo de Copaíba apresenta efeitos antiinflamatórios (Veiga Junior et al., 2001, 2006, 2007; Agra et al., 2007, 2008), antisépticos (Bruneton, 1987), ação germicida (Bloise, 2003; Biavatti et al., 2006) e antibacterianos (Bandeira, 1998; Santos et al., 2008).

Alguns autores (Almeida, 1998; Bandeira, 1998; 2000; Garrido, 2010) comprovaram ser possível a associação do óleo-resina de Copaíba, óxido de zinco e hidróxido de cálcio, propondo novos estudos para que essa associação pudesse ser utilizada em Odontologia.

Muitos parâmetros caracterizam a biocompatibilidade de um material, como citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade (Al-Hiyasat et al., 2010). A presença de efeito tóxico *in vitro* não significa que o material seja tóxico quando aplicado *in vivo*. Por outro lado, a ausência do efeito tóxico *in vitro* é possivelmente a garantia de uma boa resposta clínica (Senne et al., 2009). Ainda o teste *in vitro* propicia uma direção quanto a duração e intensidade dos efeitos citotóxicos e genotóxicos, podendo até contra indicar o uso clínico de um material, se o mesmo se encontrar fora de um padrão mínimo de toxicidade.

A determinação da viabilidade celular bem como da citotoxicidade podem ser interpretadas de várias maneiras, como por exemplo, a marcação celular com cromo radioativo (Pascon et al., 2001),

identificação do halo de inibição por contato direto material - célula, mensuração do grau de destruição da monocamada celular, contagem de células por exclusão com azul de Trypan, coloração de células viáveis por cristal violeta entre outros (Scelza et al., 2001; Cavalcanti et al., 2005; Camargo et al., 2009a).

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) vem sendo bastante utilizado como teste de citotoxicidade em cultura de células. O método de avaliação da citotoxicidade pelo uso do corante MTT tem se mostrado extremamente confiável, rápido e facilmente reproduzível, refletindo não somente o número de células em uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, pois baseia-se na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase, presentes em células viáveis (Bouillaguet et al., 2004).

Kim et al. (2007) estudaram a efetividade do teste MTT para verificação da viabilidade de células de ligamento periodontal. Para esses autores o MTT é um teste rápido, de alta eficácia, fácil manipulação e fornece imediatamente a quantidade e identificação de células viáveis. Da mesma forma, Eldeniz et al. (2007) concordam com a eficácia do MTT na avaliação do metabolismo celular após contato das células com diferentes produtos e consideram este teste simples, rápido e com resultados próximos da realidade.

Apesar da análise de citotoxicidade ser um teste bastante empregado em materiais odontológicos, a genotoxicidade de cimentos endodônticos ainda é um assunto pouco estudado.

Os testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* e são designados para detectar componentes que induzem danos ao material genético das células tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (Ribeiro et al., 2005a; Ribeiro et al., 2005b). Nas últimas décadas, ensaios de genotoxicidade têm alcançado ampla aceitação como um importante indicador carcinogênico. Dentre os testes de genotoxicidade

in vitro destacam-se o teste de células individualizadas em gel de agarose (ou teste do cometa) (Ribeiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2005b) e o teste de micronúcleo .

O teste do cometa é capaz de detectar quebra do DNA celular permitindo a mensuração do dano causado sobre o material genético. O princípio básico deste teste é a migração do DNA sobre a matriz de agarose em condições de eletroforese. Em uma visão ao microscópio de fluorescência, as células danificadas possuem aparência de um cometa, com uma cabeça (região do núcleo) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que estão fora do núcleo (Ribeiro et al., 2006). Uma vantagem significativa do teste de cometa é a aplicabilidade em qualquer tipo de célula eucariótica, além disso é de baixo custo e permite obtenção de resultados em poucas horas.

Frente a gama de produtos disponíveis destinados ao tratamento endodôntico, em especial os cimentos endodônticos para a obturação dos canais radiculares tanto de base resinosa, à base de silicone e até mesmo fitoterápicos, é de grande importância estudos relacionados aos efeitos que estes materiais podem causar aos tecidos adjacentes a região apical. Com isso, este estudo teve como hipótese que os cimentos obturadores à base de resina podem causar maiores danos celulares do que os cimentos à base de silicone e fitoterápicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cimentos endodônticos e suas propriedades

De acordo com Grossman (1958), os cimentos endodônticos devem preencher requisitos físico, químicos e biológicos para serem considerados ideais.

Muitos são os cimentos endodônticos disponíveis no mercado com diferentes propostas que buscam agregar uma maior quantidade de propriedades ideais de um material, tais como, boa tolerância tecidual (Duarte et al., 2000; Leonardo, 2008), comportamento dimensional satisfatório, “selamento hermético” do sistema de canais radiculares, solubilidade nos tecidos periapicais e não no interior dos canais radiculares (Huang et al., 2002; Cohen, Hargreaves, 2007), possuam bom escoamento (Caicedo et al., 1988), boa adesividade (Hagge et al., 2002, Tagger et al., 2002), radiopacidade satisfatória (Silva et al., 1994), não prejudiquem ou se possível induzam reparação periapical (Caicedo et al., 1988; Silva et al., 1994; Duarte et al., 2000; Tagger et al., 2002).

Além destas propriedades, outras características como diminuição do tempo de trabalho, facilidade de manipulação e aplicação, desenvolvimento de embalagens mais econômicas e menor custo estão sendo desenvolvidas, entretanto, a biocompatibilidade deveria ser um dos principais fatores que influenciasse o clínico na escolha de um cimento endodôntico (Geurtsen, 2001), uma vez que este pode permanecer em contato por um longo período com os tecidos periapicais podendo provocar um processo inflamatório e ou retardo na cicatrização tecidual

(Leonardo et al., 2008). Assim, antes de inserir um material em contato com o tecido existente, deve-se conhecer a estrutura e função deste tecido bem como as propriedades deste material (Estrela et al., 2005).

O aparecimento constante de novos materiais e a busca de um cimento obturador ideal conduzem os pesquisadores à análise das propriedades físicas e biológicas destes cimentos (Valera et al., 1998).

Atualmente, dentre as diversas formulações de cimentos endodônticos é crescente a utilização de cimentos à base de resinas. Acredita-se que os cimentos resinosos proporcionem um melhor selamento, impedindo ou diminuindo a infiltração de microorganismos no sistema de canais radiculares.

O cimento AHPlus é um material que tem como base uma resina epóxica, composto por duas pastas, sendo de fácil manipulação, boa adaptação às paredes do canal radicular e apresentando estabilidade dimensional a longo prazo (Schafer , Zandbiglari, 2003; Versiani et al., 2006). O fabricante lista dentre as propriedades do produto baixa contração de polimerização, alta estabilidade, baixa solubilidade, alta radiopacidade, tolerância ao calor não perdendo suas propriedades químicas durante a termoplastificação. Apresenta boa propriedade biológica demonstrada pela avaliação da resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães após pulpectomia onde observou-se a formação de tecidos duros na região periapical (Leonardo et al., 2008; Tanomaru-Filho et al., 2009).

Para Leonardi et al., (2009), entre os fatores biológicos, a ação antimicrobiana é imprescindível, pois visa eliminar remanescentes microbianos do preparo biomecânico e da medicação intracanal. Com isso, avaliaram a ação antimicrobiana do AHPlus quando comparado ao Endofill, Sealer 26 e Acroseal. Para a avaliação da ação antimicrobiana dos cimentos, utilizaram-se amostras dos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus cereus* (CCCD – B001) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foram obtidas

culturas recentes desses microrganismos por meio de inoculação em 5 mL de meio de cultura brain heart infusion (BHI) com incubação a 37°C. Depois da absorção, escavaram-se poços com auxílio de um punch de 6 mm de diâmetro, posteriormente preenchidos com os cimentos endodônticos. As placas ficaram em repouso em temperatura ambiente por 2 horas para difusão dos cimentos no meio de cultura e em seguida foram incubadas em estufa bacteriológica (FANEM®, São Paulo, Brasil) a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, a leitura foi realizada verificando-se ausência ou presença de halo de inibição. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos por três observadores com auxílio de uma régua milimetrada transparente. Entre os microrganismos empregados, o cimento Acroseal promoveu a formação de halo de inibição apenas para *S. aureus* e *B. cereus*; contra *B. cereus* causou o menor halo formado. O cimento AHPlus mostrou maior halo de inibição para *E. coli*, seguido por *S. aureus*, *E. faecalis* e *B. cereus*. Para o cimento Sealer 26, o maior halo de inibição ocorreu para *S. aureus*, e em sequência vieram *E. coli*, *B. cereus* e *E. faecalis*. O cimento Endofill mostrou halo de inibição maior ante *E. coli*, seguido por *S. aureus*, *B. cereus* e *E. faecalis*. O maior halo formado entre os cimentos testados foi para o AH Plus perante *E. coli*. Conclui-se que a maioria dos cimentos endodônticos avaliados apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos usados, e os cimentos que mostraram maior poder antimicrobiano foram o AH Plus e o Endofill.C, por 72 horas em condições de aerobiose. e observaram que o AHPlus e o Endofill apresentaram alto poder antimicrobiano principalmente contra *Escherichia coli*.

Kopper et al. (2003) compararam *in vivo* a capacidade de vedamento de três tipos de cimentos, AH Plus (à base de resina epóxica), Sealer 26 (à base de hidróxido de cálcio) e Endofill (à base de óxido de zinco e eugenol). Concluíram que, após 45 dias de exposição ao meio bucal, nenhum dos materiais foram capazes de prevenir a infiltração do corante utilizado, porém em termos de penetração média ocorreram

diferenças significativas entre os cimentos estudados, sendo que o AH Plus apresentou menor penetração seguido do Endofill e Sealer 26, respectivamente.

Timpawat et al. (2001) avaliaram a infiltração bacteriana coronária de canais obturados com AH Plus (à base de resina epóxica), Apexit (à base de hidróxido de cálcio) e Ketac Endo (cimento de ionômero de vidro) durante 30 e 60 dias. De acordo com os resultados, concluíram que o cimento AH Plus foi o mais eficiente na adaptação às paredes do canal e como material de preenchimento quando exposto à infiltração bacteriana coronária deste estudo.

Além dos cimentos resinosos à base de resina epóxica, EndoRez é um material resinoso à base de UDMA, que possui propriedades hidrofílicas (Zmener et al., 2008; Hammad et al., 2008; Tay et al., 2005; Bergmans et al., 2005) capazes de melhorar sua propriedade de vedamento mesmo em canais úmidos, sendo efetivo na penetração dos túbulos dentinários e adaptação às paredes dentinárias (Kim et al., 2010).

Scarparo et al. (2009) analisaram os cimentos EndoRez, AH Plus e Endofill, implantados em tecidos subcutâneos de ratos. Após 7, 30 e 60 dias, realizaram a coleta de tecidos para biópsia e a avaliação microscópica dos componentes celulares inflamatórios, mostrou que os cimentos EndoRez e EndoFill apresentaram processos inflamatórios mais intensos e duradouros. Entretanto, a reação inflamatória do AH Plus mostrou uma tendência a diminuir ao longo do tempo. O único grupo a mostrar uma redução significativa da inflamação durante o período de 60 dias foi o grupo controle. Nenhum dos materiais testados exibiram características ideais de biocompatibilidade.

Gencoglu et al. (2010) avaliaram a toxicidade de dois cimentos EndoRez e GuttaFlow em subcutâneo de ratos, utilizando parâmetros histológicos e bioquímicos, concluindo que ambos os cimentos mostraram boa compatibilidade tecidual e toxicidade aceitável.

Roeko Seal é um cimento endodôntico à base de silicone que tem mostrado boas propriedades físico-químicas, como adequada fluidez (Testarelli et al., 2003) e baixa ocorrência de infiltração apical (Cobankara et al., 2002; Wu et al., 2006), além de baixa citotoxicidade (Miletic et al., 2005; Lodiene et al., 2008).

Leonardo et al. (2008) avaliaram a biocompatibilidade do RoekoSeal com os tecidos periapicais de cães e compararam com o AH Plus. As polpas de 32 dentes foram removidas, o cimento apical foi perfurado, preparo biomecânico realizado, e os canais foram obturados pela técnica de condensação lateral. Noventa dias após cirurgia, os animais sofreram eutanásia, o bloco dente e osso foi removido, e as amostras foram preparadas para análise microscópica. No grupo RoekoSeal, foi observada deposição de tecido mineralizado, com completa neoformação de tecido apical em 43,8% dos dentes e selamento parcial em 56,2%. No grupo AH Plus, em 12,5% houve completa neoformação de tecido apical mineralizado, em 75% o selamento foi parcial, e em 12,5% não houve selamento. Não houve diferença entre os grupos em relação ao infiltrado inflamatório; espessura do ligamento periodontal; e reabsorção de dentina, cimento ou osso. O RoekoSeal mostrou respostas biológicas satisfatórias quando comparado aos efeitos do AH Plus.

Huumonen et al. (2003) avaliaram radiograficamente o processo de reparo apical de 199 dentes humanos, obturados com Grossman e Roeko Seal Automix, 3 e 12 meses após a obturação do canal radicular. Os autores ressaltaram a ausência de diferença significativa entre os dois cimentos avaliados.

Atualmente, pesquisadores têm estudado materiais fitoterápicos, os quais apresentam melhores respostas de biocompatibilidade do que alguns cimentos convencionais. Acreditando-se nesse princípio o cimento à base de óleo resina de Copaíba foi desenvolvido como material endodôntico (Almeida, 1998; Bandeira, 1998,

2000; Garrido, 2010). Alguns autores comprovaram ser possível a associação da ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio com a ação antiséptica do óxido de zinco e as propriedades do óleo resina de *Copaífera multijuga* Hayn criando um cimento para uso na Odontologia. O óleo de Copaíba que é um produto extraído de várias espécies do gênero *Copaífera* (Veiga Junior, Pinto, 2002) apresenta efeitos antiinflamatórios (Veiga Júnior et al., 2001, 2006, 2007; Agra et al., 2007, 2008) antitumorais (Lima et al., 2003), antisépticos (Bruneton, 1987), ação germicida (Bloise, 2003; Biavatti et al., 2006), antibacterianos (Opdyke, 1976; Lima et al., 1995; Bandeira, 1998; Santos et al., 2008) e antifúngico (Bandeira et al., 2006).

Atualmente, é bem aceito o fato que produtos naturais, especialmente àqueles derivados de extratos vegetais ou da fermentação de bactérias, possam produzir medicamentos ou materiais mais biocompatíveis (Sabir et al., 2005; Andrighetti-Fröhner et al., 2006). Entretanto, todo medicamento fitoterápico deve ser testado quanto à sua toxicidade (Maistro et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006).

A atividade antimicrobiana de um cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba foi estudada frente às cepas padrão de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. Este cimento cuja composição é a associação de óxido de zinco, hidróxido de cálcio e óleo-resina da Copaíba foi comparada aos resultados obtidos por cada um desses componentes isoladamente. Foi verificado que todos os grupos apresentaram atividade antibacteriana e que o óleo-resina da Copaíba apresentou melhores resultados (Vasconcelos et al., 2008).

De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Garrido (2010), o cimento à base do óleo-resina da Copaíba (Cop Endo) possui propriedades favoráveis à sua utilização clínica incluindo pouca ou nenhuma irritação tecidual, capacidade de estimulação no processo de reparo e cicatrização, propriedades antibacteriana, antiinflamatória; além de cumprir todos os requisitos físico-químicos exigidos pela ADA como

adequado tempo de presa, espessura de película, solubilidade, estabilidade dimensional (Rosa et al., 2010), escoamento e radiopacidade. Além disto, este cimento tem custo três vezes menor que o Endofill, quatro vezes menor que o Sealer 26, e seis vezes menor que o AH Plus, o que contribui para atingir uma maior possibilidade de tratamento à sociedade (Garrido et al., 2010).

2.2 Testes de Citotoxicidade

O estudo da biocompatibilidade é de extrema importância, uma vez que os materiais endodônticos dos mais diferentes tipos e composições ficarão em contato direta ou indiretamente com os tecidos apicais e periapicais, por tempo indeterminado (Schmalz, 1994; Schmalz, 2002). Portanto, é importante que se tenham cimentos suficientemente compatíveis capazes de permitir a manutenção da viabilidade do tecido remanescente ou ainda estimular o processo de reparação.

De acordo com as pesquisas, muitos dos cimentos utilizados na Endodontia presentes no mercado, apresentam um grau variável de citotoxicidade, dependendo das condições sob as quais foram testadas (Ersev et al., 1999), tal fato dá espaço para uma contínua procura por mais informações a este respeito.

Para avaliar o comportamento biológico de cimentos endodônticos, existem diversos métodos empregados no estudo de biocompatibilidade de materiais. Na Odontologia, conforme estabelecido pela *Federation Dentaire International*, para análise dos materiais, eles devem ser submetidos primeiramente aos testes iniciais, seguidos pelos testes secundários e finalizados pelos de aplicação clínica. O cultivo celular se destaca como opção dentre os testes iniciais, devendo preferencialmente simular as condições de uso no tecido de destino. Os

produtos devem ser submetidos aos testes secundários somente nos casos em que obtiveram resultados satisfatórios nos testes primários. A coerência entre os resultados dos testes primários é necessária antes da realização dos testes secundários (Camps et al., 1992).

Quando devidamente padronizados, os testes de citotoxicidade em cultura de células são facilmente reproduzidos, produzem resultados rápidos e bastante sensíveis, além de possibilitarem o controle da maior parte das variáveis. Estes testes são de custo relativamente baixo, e determinam de maneira preliminar o possível efeito citotóxico de um determinado material experimental ou de seus componentes isolados, determinando a necessidade de dar continuidade na avaliação nos demais níveis de pesquisa, podendo reduzir inclusive a necessidade de testes em animais (Costa, 2001). Por definição, citotoxicidade de um material significa o efeito destrutivo que este provoca às células (Li, 1996).

Para análise do efeito citotóxico sobre células, é de grande valia a utilização do ensaio de MTT, que se apresenta como um teste rápido, de fácil aplicação e sensível, por meio da leitura da absorbância realizada pelo espectrofotômetro, obtém-se quantitativamente a viabilidade celular.

Kim et al. (2007) estudaram a efetividade do método do corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) para verificação da viabilidade de células de ligamento periodontal. O MTT vem sendo utilizado para testes de citotoxicidade em cultura de células, avaliando o metabolismo mitocondrial das mesmas. Para esses autores este é um teste rápido, de alta eficácia, fácil manipulação e fornece imediatamente a quantidade e identificação de células viáveis. Da mesma forma, Eldeniz et al. (2007) concordam com a eficácia do MTT na avaliação do metabolismo celular após contato das células com diferentes produtos e consideram este teste simples, rápido e que garante resultados reais.

A importância do estudo *in vitro* está na projeção da segurança da utilização dos materiais na vivência clínica, uma vez que por meio destes, é possível observar efeitos sobre células para prevenir ou garantir o uso em organismos. Por vezes se faz necessário, o estudo dos efeitos dos materiais durante diferentes períodos, para melhor observar os seu comportamento com o decorrer do tempo.

Para Schmalz (1994), a toxicidade de um material odontológico pode ser avaliada por testes *in vitro*, experimentais em animais ou por estudos clínicos em humanos. Os testes *in vitro* são os mais utilizados para se avaliar a citotoxicidade ou genotoxicidade de um material utilizado na Odontologia. Para os materiais odontológicos, a técnica em cultura de células é a mais indicada e utilizada; sendo que o contato entre as células e os materiais a serem testados, pode ocorrer de maneira direta ou indireta.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para analisar viabilidade ou sobrevivência de células são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários, sendo uma análise de menor custo e de maior reprodutibilidade do que testes executados em animais (Camps, About, 2003; Souza et al., 2006; Lodiene et al., 2008).

Muitas são as formas dos ensaios de citotoxicidade, Senne et al., 2009, avaliaram a citotoxicidade de dois cimentos à base de resina epóxica (Sealer 26 e AH Plus) e de um cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Endofill), sob a linhagem de células VERO C1008. A citotoxicidade foi avaliada por meio do reagente FluoroQuench™ AO/EB, e o uso do corante Panótico Rápido LB (Laborclin), um sistema de coloração diferenciado muito usado em hematologias serviu para avaliar as alterações morfológicas nas células, logo após a manipulação com o cimento fresco e em 24, 48 e 72 h após o contato com os cimentos. Os cimentos foram manipulados de acordo com as recomendações dos fabricantes para o experimento com cimentos endurecidos estes ficaram

armazenados por uma noite, cerca de 12 h, em luz ultravioleta, a fim de prevenir qualquer contaminação antes de entrarem em contato com a suspensão celular. Todas as placas ficaram incubadas a 37°C, as observações foram concluídas em 24, 48 e 72 h. Passado o período de 12h, 2µl de suspensão celular a uma concentração de $3,5 \times 10^5$ foram dispensados sobre os cimentos. Decorrido o tempo de 1 h, dispensaram-se 5 µl do corante FluoroQuench™ em cada poço. A observação foi realizada pela extensão relativa correspondente às áreas de coloração verde fluorescente, representativa de células viáveis, em cada amostra exposta aos cimentos. A aferição foi procedida pelo software Image Pro Plus (Media Cybernetic) e submetida ao teste paramétrico t de student. Concluíram que todos os cimentos testados foram citotóxicos em algum momento, mostrando diferentes níveis na proliferação e na morfologia celular. cimento Endofill, à base de óxido de zinco e eugenol, foi altamente citotóxico tanto fresco quanto depois do endurecimento, para ambas as metodologias empregadas. Sealer 26 de comportamento bem semelhante, porém mostrando no intervalo de 24 h ter sido significativamente melhor que o Endofill quando endurecido. O AH Plus foi o cimento apresentou melhores resultados quanto ao aspecto morfológico das células, após o seu endurecimento e menor citotoxicidade.

Lodiane et al. (2008) compararam a toxicidade do AH Plus, EndoREZ, RoekoSeal e Epiphany, utilizando os testes de difusão em filtro e de MTT em fibroblastos L929. Os espécimes dos cimentos foram preparados em anéis de plástico não reativo de 5 mm de diâmetro, e utilizados por contato direto no teste de difusão em filtro Millipore e na forma de extratos (contato indireto) no ensaio de MTT. O teste de difusão em filtro mostrou que o Epiphany e o AH Plus, quando colocados em contato com as células logo após a manipulação dos cimentos (tempo de endurecimento 0 h), mostraram-se severamente tóxicos, enquanto que o RoekoSeal e o EndoREZ mostraram-se não tóxicos. Quando atingiram tempo de endurecimento 24 h, o Epiphany mostrou toxicidade moderada,

enquanto que o AH Plus, RoekoSeal e EndoREZ não mostraram toxicidade. No teste de MTT, quando endurecido, o Epiphany mostrou-se severamente mais tóxico que os outros materiais. Porém, (Oztan et al., 2003) igualmente utilizando culturas de células L-929, por meio do ensaio MTT, concluíram que os cimentos AH Plus e RoekoSeal apresentaram níveis mais baixos e similares de citotoxicidade .

Bouillaguet et al. (2004) avaliaram a citotoxicidade do Pulp Canal Sealer, RoekoSeal, Top Seal e EndoREZ pelo teste de MTT em fibroblastos Balb C 3T3. Os cimentos foram preparados e alocados em discos Teflon de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura e colocados em contato com meio de cultura na proporção $1,88 \text{ cm}^2/\text{mL}$ (área do disco/volume de meio de cultura). Estes cimentos foram avaliados em tempos de endurecimento 0 h e 24 h, e em três períodos de exposição às células (24 h, 48 h e 1 semana). O Roeko Seal foi o único material que apresentou baixa citotoxicidade no tempo de endurecimento 0 h. Após 24 h, o RoekoSeal obteve resultados estatisticamente semelhantes ao controle negativo (células sem tratamento). Os outros cimentos apresentaram citotoxicidade maior que o controle negativo em até 60%, e todos se tornaram mais tóxicos conforme maior tempo de exposição ao meio de cultura celular.

Quatro cimentos endodônticos à base de resina metacrilato, EndoREZ, RealSeal, MetaSEAL e RealSeal SE foram submetidos ao teste de MTT. Os cimentos foram preparados e colocados sobre discos Teflon (3 mm de espessura x 5 mm de diâmetro). Após a polimerização dos cimentos, eles foram colocados em contato com células de osteossarcoma de rato (ROS 17/2.8) e meio de cultura na proporção área/volume de $150 \text{ mm}^2/\text{mL}$. Os testes foram realizados após o período de 72 h, e então por cinco semanas sucessivas. Após cada teste os espécimes foram removidos, lavados e imersos em solução simulada de fluido corporal (SBF). Inicialmente, todos os cimentos exibiram severa toxicidade. Após 5 ciclos de imersão em SBF, os

cimentos EndoREZ e RealSeal permaneceram severamente tóxicos. Com o passar do tempo a toxicidade do MetaSEAL e do RealSeal SE diminuíram gradualmente. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou variados graus de injúria celular refletindo a toxicidade do RealSeal SE e células com mitocôndria intacta foram identificadas após o cimento se tornar não tóxico, na 5ª semana (Ames et al., 2009).

Al-Hiyasat et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade de quatro cimentos endodônticos, AH Plus, EndoRez, Epiphany e MetaSeal sobre células de fibroblastos C 3T3. Os cimentos foram manipulados de acordo com as recomendações dos fabricantes, um grama de cada material foi acondicionado no fundo de placas de 6 poços em forma de aproximadamente 20 discos pesando 50mg cada um. Os espécimes foram cobertos por 10 ml de PBS e deixados por 1 semana em estufa a 37° C. Uma quantidade de 5×10^3 de células foram cultivadas em placas de 96 poços, por 48 horas a 37° C e 5% de CO₂. Após este período 10µl dos extratos originais e uma diluição de 1 em 10v/v foram colocados em contato com 90µl de cultura celular durante 48 horas a 37° C e 5% de CO₂, o grupo controle foi tratado com a mesma quantidade de PBS. A atividade citotóxica foi avaliada utilizando o teste do MTT. Nos extratos originais, todos os materiais promoveram diminuição da viabilidade, AH Plus apresentou menor citotoxicidade, seguido por EndoRez, Epiphany e o MetaSeal. Já na diluição utilizada do extrato original o AH Plus mostrou-se menos citotóxico, porém agora seguido do Epiphany, EndoRez e MetaSeal. Curiosamente a diluição do extrato original diminuiu a viabilidade do MetaSeal de 11% para 9.5%.

Em 2011, Karapinar-Kazandag et al. estudaram a citotoxicidade do AH Plus, EndoREZ, RoekoSeal, Epiphany e Activ GP em fibroblastos L929 e células primárias de polpa humana utilizando o teste MTS (3 - (4,5-dimetil-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) -2 - (4 sulfophenyl)-2H-tetrazólio). Os espécimes foram preparados, colocados em anéis de Teflon (4 mm de diâmetro/ 2 mm de altura), mantidos em

estufa até o período de endurecimento fornecido pelo fabricante e colocados em 2,5 mL de meio de cultura por 1, 4 e 7 dias em estufa a 37°C. Para os testes foram utilizados os extratos originais e duas diluições (25% e 50%). Os cimentos Activ GP e Epiphany foram significativamente mais tóxicos que os outros cimentos, porém suas citotoxicidades diminuíram quando os extratos foram diluídos. O Epiphany tornou-se mais tóxico no período de 7 dias. Nenhuma ou mínima toxicidade foi observada com o RoekoSeal, AH Plus e EndoREZ.

Silva-Herzog et al. (2011) avaliou a biocompatibilidade de três cimentos endodônticos Roeko Seal, AH Plus e Sealapex, por meio da resposta inflamatória tecidual a três cimentos endodônticos utilizando um método físico-químico para a quantificação da permeabilidade vascular, por análise espectrofotométrica e análise histopatológica durante os períodos (1, 3, 7 e 14 dias). No subcultâneo de vinte e oito ratos machos foram injetados os cimentos avaliados e solução salina e Chloropercha como controles positivo e negativo, respectivamente. Quanto a resposta inflamatória tecidual, em 24 horas não houve diferença significativa entre os grupos, em 3, 7 e 14 dias RoekoSeal teve os menores valores de absorbância, seguido pelo AH Plus e Sealapex. Estes resultados indicam que RoekoSeal produziu a menor quantidade de exsudato inflamatório. Os resultados da análise histopatológica revelou uma correlação com os resultados da análise espectrofotométrica. Onde o Sealapex apresentou-se semelhante ao grupo controle positivo a inflamação aguda foi observada seguida de inflamação crônica em 14 dias. AH Plus produziu uma inflamação aguda grave às 24 horas e 3 dias. Aos 7 dias, as células mononucleares foram observadas com a presença de macrófagos e células de plasma até o dia 14 de avaliação, mediando uma resposta inflamatória crônica. RoekoSeal difere dos outros resultados. Às 24 h, houve um infiltrado de neutrófilos, indicando uma leve inflamação aguda. Menos 3 dias, linfócitos e fibroblastos foram observados em torno do material e formação de cápsula foi observado no sétimo dia de avaliação.

Aos 14 dias, um tecido cicatricial fibroso foi observado com ausência total de células inflamatórias, o que sugere a compatibilidade ao tecido a este cimento.

A citotoxicidade dos cimentos RoekoSeal Automix (RSA) e AH Plus foram avaliadas em células de fibroblastos de ratos (L929) e células de carcinoma cervical humano (HeLa) nos períodos de 1 h, 24 h, 48 h, 7 dias e 1 mês. Os resultados mostraram que AH Plus foi significativamente mais citotóxico após 1 h, 24 h e 48 h, em comparação com o dia 7 e 1 mês em ambas linhagens celulares. Já, o RoekoSeal não teve efeito citotóxico em ambas linhagens celulares e em todos os períodos de avaliação (Miletic et al., 2005). Entretanto, Oztan et al. (2003) verificaram pelo ensaio de MTT que o RoekoSeal e o AH Plus apresentaram baixa citotoxicidade sobre cultura de fibroblastos L929.

Os efeitos citotóxicos de cinco novos cimentos endodônticos (RC Sealer, Epiphany, EndoREZ, GuttaFlow e Acroseal) e três produtos já existentes (AH Plus, RoekoSeal e Apexit) foram avaliados sobre duas linhagens celulares. A citotoxicidade foi avaliada por meio do teste de MTT utilizando fibroblastos gengivais humanos (HGF) e fibroblastos de rato (L929). Concluíram que os materiais à base de resina (Epiphany e EndoREZ) e de hidróxido de cálcio (Apexit e Acroseal) foram significativamente mais citotóxicos do que outros cimentos ($P < 0,05$). No entanto, as células L929 foram mais sensíveis ao Apexit e EndoREZ que as células HGF. RC Sealer apresentou citotoxicidade suave e AH Plus não exerceu qualquer efeito citotóxico para células HGF. RoekoSeal e GuttaFlow também demonstrou citotoxicidade suave. GuttaFlow foi ligeiramente mais citotóxico para ambas as culturas. Nas condições do estudo, os cimentos RC Sealer e GuttaFlow foram os menos tóxicos. (Eldeniz et al., 2007)

Em 2002, Schwarze et al. estudaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos N2, Apexit, RoekoSeal, AH Plus, Ketac Endo, Endometasona e cones de guta-percha em fibroblastos 3T3 e fibroblastos

primários de ligamento periodontal humano pelo teste XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide). Vinte e quatro dentes unirradiculados foram preenchidos com estes cimentos e um cone de guta-percha. No grupo controle os dentes foram preenchidos somente com guta-percha. Os dentes ficaram em contato com meio de cultura e a cada semana este meio foi removido para a realização dos testes, durante 1 ano. Nas condições em que o estudo foi realizado somente o N2 apresentou efeitos severos na atividade metabólica das células. Durante as 24 h iniciais todos os cimentos apresentaram alteração no metabolismo celular, porém não foi significativa em relação ao grupo controle.

Susini et al. (2006) avaliaram a citotoxicidade do Epiphany + cones Resilon, RoekoSeal + cones de guta-percha e Sealite + cones de guta-percha utilizando trinta dentes unirradiculados preenchidos com estes materiais pela técnica da condensação lateral. Os dentes foram mantidos em estufa por 1 dia para o endurecimento dos cimentos. Durante 30 dias os ápices das raízes foram mantidos em contato com 1 mL de meio de cultura, sendo renovado todos os dias para simular as condições do ligamento periodontal. Os meios de cultura removidos após 1, 2, 7 e 30 dias foram expostos a fibroblastos de ratos (L929) e submetidos ao teste de MTT. Os resultados mostraram que após 7 e 30 dias nenhum dos cimentos apresentou citotoxicidade. Após 1 dia, a citotoxicidade dos materiais em ordem decrescente pode ser apresentada: Epiphany + cones Resilon > RoekoSeal + cones de guta-percha > Sealite + cones de guta-percha.

2.3 Testes de genotoxicidade

Os danos causados ao material genético das células são

também estudados dentro dos testes de biocompatibilidade, nomeados como teste de genotoxicidade com aplicabilidade *in vitro* e *in vivo* e são designados para detectar componentes que induzem danos ao material genético tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (Ribeiro et al., 2006). Nas últimas décadas, os ensaios de genotoxicidade têm alcançado ampla aceitação como um importante indicador carcinogênico. Entretanto, a genotoxicidade de cimentos endodônticos tem sido pouco estudada sobre células eucarióticas (Geurtsen, 2001; Tai et al., 2002).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* mais utilizados são o teste de células individualizadas em gel de agarose (ou teste do cometa) (Ribeiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2006) e o teste de micronúcleo (Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

O teste do cometa é capaz de detectar quebra do DNA celular permitindo a mensuração do dano causado sobre o material genético. O princípio básico deste teste é a migração do DNA sobre a matriz de agarose em condições de eletroforese. Em uma visão no microscópio de fluorescência, as células danificadas possuem aparência de um cometa, com uma cabeça (região do núcleo) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que estão fora do núcleo (Silva et al., 2003; Ribeiro et al., 2006).

Camargo et al. (2009), avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de materiais de capeamento pulpar, incluindo um cimento de hidróxido de cálcio (HC), MTA branco, MTA cinza e Polímero derivado do óleo da mamona (POM) em duas linhagens celulares. As células pulpares humanas transformadas (tHPC) foram submetidas aos testes de cristal violeta e de produção de ROS (mensuração dos níveis de espécie reativos de oxigênio), e os fibroblastos pulmonares de hamster Chinês (V79) submetidos ao teste de micronúcleo (MNT) e análise do ciclo celular. Concluíram que o POM, o MTA branco e o MTA cinza não apresentaram citotoxicidade e não induziram produção de ROS sobre as

células tHPC, diferentemente do HC. Ainda, todos os materiais estudados não foram genotóxicos sobre as células V79.

Em outro estudo os aspectos toxicológicos do Acroseal, Epiphany, AH Plus e Polímero do óleo da mamona (POM) foram analisados pelos testes de citotoxicidade e de produção de ROS sobre células de polpa humana e pelos testes de micronúcleo e análise do ciclo celular sobre as células V79. Quando comparado aos outros cimentos o POM não mostrou citotoxicidade. O Acroseal foi o material mais citotóxico e genotóxico, porém o Epiphany promoveu maior produção de ROS. O AH Plus foi citotóxico apenas em seu extrato original, perdendo fortemente sua toxicidade após a primeira diluição (Camargo et al., 2009a).

Cavalcanti et al. (2006) estudaram a genotoxicidade do ácido Kaurenóico presente no óleo da Copaíba em células V79 pela utilização dos testes cometa e MNT. Foram testadas as concentrações de 2,5; 5; 10; 30; e 60 µg/ml com tempo de tratamento de 3 horas. Os resultados mostraram que o ácido kaurenóico apresentou danos ao DNA nas condições em que o estudo foi realizado.

Miletic et al., (2003), compararam o AH 26 e o AH Plus quanto a citotoxicidade e genotoxicidade em células V79. Para a análise da citotoxicidade, os extratos dos cimentos foram preparados em diluições de DMSO e as culturas marcadas pela coloração com corante Nigrosin nos períodos de 1 h, 24 h e 7 dias. Já, a genotoxicidade dos cimentos foi avaliada pela formação de micronúcleos em linfócitos humanos. Ambos os cimentos apresentaram citotoxicidade similar em altas concentrações, entretanto, não induziram aberrações cromossômicas ou indução de formação de micronúcleos anormais em nenhum período experimental. Porém, em outro estudo, estes mesmos cimentos, também diluídos em DMSO, apresentaram-se citotóxicos e genotóxicos quando submetidos aos testes de MTT e Cometa, respectivamente (Huang et al., 2002). Portanto, dependendo do tipo de

teste realizado e do tipo de célula utilizada os resultados podem ser diferentes.

O potencial genotóxico *in vitro* do formocresol, do paramonoclorofenol e do hidróxido de cálcio foi avaliado sobre células de linfoma de ratos e fibroblastos humanos pelo ensaio do cometa. Os resultados revelaram que todos os compostos não promoveram dano ao DNA celular nos períodos e nas concentrações testadas (Ribeiro et al., 2004).

Schweikl e Schmalz (2000) verificaram a citotoxicidade e a genotoxicidade do cimento AH Plus e de seus componentes (pasta A e pasta B) por meio da indução de micronúcleo em células V79. O AH Plus foi testado imediatamente após a manipulação e depois de 24 h do tempo de presa. Os materiais foram diluídos em DMSO e solução salina fisiológica por 24 h. As pastas A e B diluídas em DMSO reduziram a viabilidade das células V79, sendo que os números de micronúcleos foram sete vezes maiores em culturas de células tratadas comparadas ao controle não tratado. Após 24 h, nenhuma genotoxicidade foi observada no AH Plus diluído com DMSO ou solução salina fisiológica. No entanto, os autores evidenciaram a indução de mutações cromossômicas do AH Plus imediatamente após a manipulação.

Ainda Tai et al. (2002) examinaram o potencial genotóxico de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e resinosos sobre células eucarióticas. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos de quatro cimentos endodônticos (Canals, N2, AH26 e AH Plus) foram avaliados pelo ensaio de MTT, ensaio de precipitação do DNA e análise da fragmentação do DNA sobre culturas de fibroblastos V79. Os resultados mostraram que todos os cimentos foram citotóxicos às células V79. A toxicidade decresceu na ordem $N2 > AH26 > AH Plus > Canals$. Em adição, N2, AH26 e AH Plus exibiram genotoxicidade pela quebra de cadeias simples de DNA e digestão do DNA genômico. Entretanto, N2 foi o cimento mais tóxico entre os cimentos testados. Estes achados

sugerem que os cimentos mostraram diferentes efeitos tóxicos dependendo do tipo e dos componentes. Os cimentos endodônticos contendo bisfenol A e formaldeído em sua composição, provaram ser não somente citotóxicos, mas também genotóxicos.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo propôs avaliar *in vitro* os possíveis efeitos citotóxicos por meio do ensaio de MTT e genotóxicos pelo teste cometa de extratos de cimentos endodônticos logo após a manipulação (0 h) e após 12 h e 24 h, sobre cultura de fibroblastos pulmonares de Hamster chinês (V79).

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Anexo A).

4.1 Cultivo das células

Foram utilizados fibroblastos de hamster Chinês (V79) obtidos do Banco de células do Rio de Janeiro - BCRJ. As células foram cultivadas em meio de cultura composto por meio mínimo essencial de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) e solução de penicilina (10000 U.I./mL) e estreptomicina (10mg/mL) a 1% (Cultilab Ltda, Campinas - SP, Brasil) (Figura 1). Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo celular de 75 cm³ – 270 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) e após apresentar 80% de confluência da camada de células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato - PBS (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) (Figura 1) e destacadas com auxílio de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) (Figura 1). Em seguida, essas células foram semeadas em dois novos frascos de cultivo de 75 cm³. Após atingirem a quantidade de células suficiente para a realização do plaqueamento, as células foram semeadas em placas com 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), onde receberam os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados serão descritas a seguir.



Figura 1 - Meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina.

4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco médio para cultura de célula (garrafa 75 cm³ – 270 mL) foram pipetados 10 mL de meio de cultura; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. O meio de cultura, além de servir como nutrição para as células, também serve para neutralizar o DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich Co., Germany), substância na qual a célula é congelada e que em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. No livro de

registros do banco de células do laboratório de cultura de células da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/SP – UNESP foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) (Figura 2a) que continham as células desejadas. Um tubo criogênico (TPP, Trasadingen, Suíça) (Figura 2b) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento do conteúdo contido no mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no frasco de cultura de células contendo meio de cultura (Figura 2c).

O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica Leitz, Germany) para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37° C com tensão de CO₂ 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).



Figura 2 - a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) coleta das células V79 do tubo criogênico; c) inserção das células na garrafa de cultivo celular.

4.1.2 Troca de meio

O meio de cultura foi trocado apenas quando não houve crescimento celular suficiente para a realização da subcultura. As células foram removidas da estufa e verificadas no microscópio de luz invertida (Leica, Germany). O meio de cultura foi aspirado e em seguida as células foram lavadas com 5 mL de PBS para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco e levado novamente à estufa.

4.1.3 Subcultura

A subcultura foi realizada quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) (Figura 3a). Desta forma, as células foram passadas de um frasco para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular. As células removidas da estufa foram levadas à capela de fluxo laminar, onde o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi aspirado. As células foram lavadas com 5 mL de PBS, que foi aspirado em seguida e, então, foi adicionado ao frasco 3 mL de tripsina, utilizada para destacar as células. O frasco com tripsina foi levado à estufa onde permaneceu por 5 minutos e em seguida foram realizadas leves batidas no fundo do frasco, para auxiliar na remoção destas. Estando as células prontas, foram adicionados 6 mL de meio de cultura sobre elas, neutralizando a tripsina.

Todo o conteúdo foi colocado em um tubo falcon (TPP, Trasadingen, Suíça) e, então, levado à centrífuga (Quimis Aparelhos

Científicos, Brasil) por 5 minutos a 1000 rpm para a formação de um precipitado de células, chamado de *pelet*.

O sobrenadante foi aspirado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura fresco, estando bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de mesmo tamanho, contendo 10 mL de meio de cultura, preparados previamente (Figura 3b). Os frascos foram levados novamente à estufa onde permaneceram até a troca de meio e/ou realização de uma nova subcultura. Esse procedimento foi realizado até que as células estivessem em quantidade suficiente para realização da contagem e do plaqueamento.

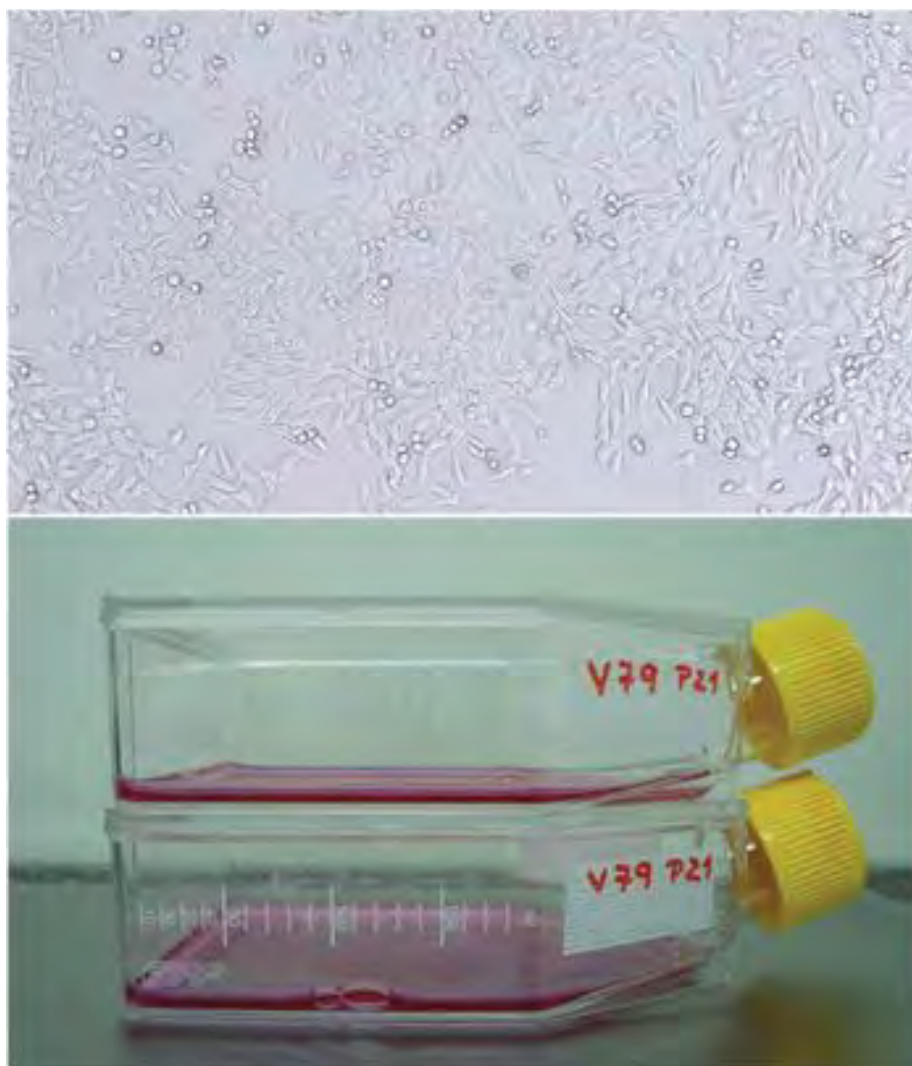


Figura 3 – a) imagem microscópica (40x) indicando 80% de confluência das células V79; b) garrafas de cultivo celular para a realização da subcultura.

4.1.4 Contagem de células

As células foram contadas antes do plaqueamento a fim de que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas de 96 poços. Foram realizados os mesmos passos da subcultura (Figura 4a) até a obtenção do *pelet* (Figura 4b); sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio de cultura fresco. Dessa suspensão foram retirados 10 µL os quais foram levados à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany) (Figura 4c), que foi levada ao microscópio de luz invertida para realizar a contagem das células presentes nos quatro quadriláteros periféricos (Figura 4d). Para obtenção da quantidade de células por mL, foi utilizada a seguinte fórmula:

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

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos.

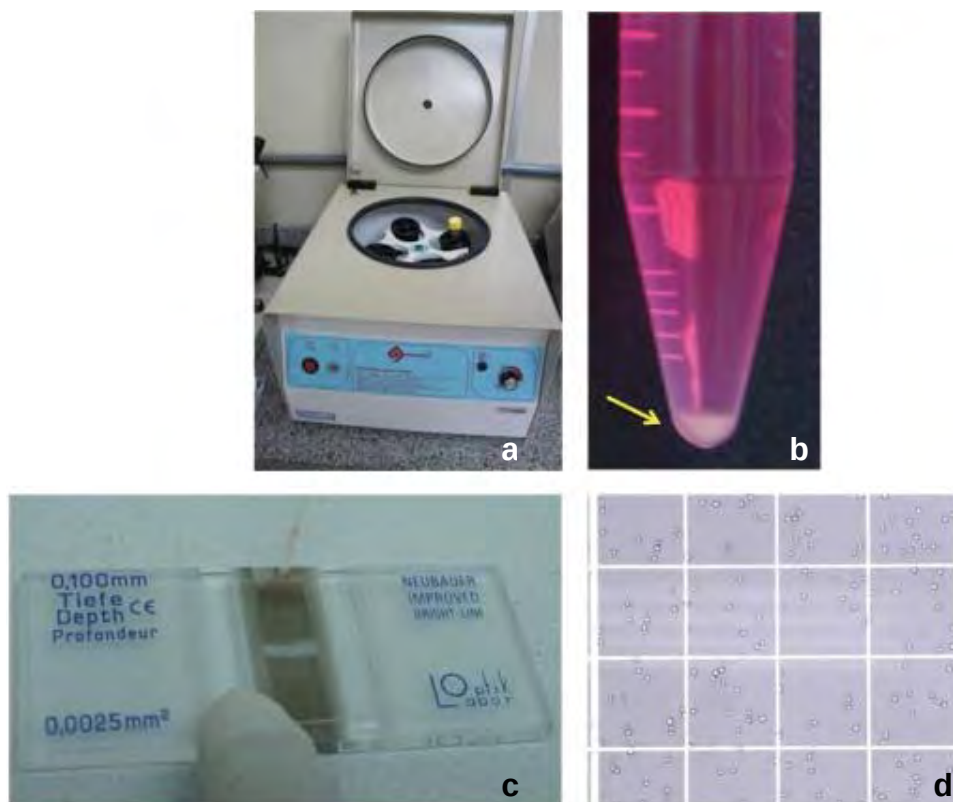


Figura 4 – a) Centrifugação para obtenção do *pelet*; b) *pelet*; c) suspensão celular sendo inserido na câmara de Neubauer; d)) imagem microscópica (40x) das células V79 em um quadrante da câmara de Neubauer.

4.2 Plaqueamento

Para cada cimento avaliado, foram utilizadas 3 placas de 96 poços. Em cada placa, foram utilizados quatro espécimes (poços) para o extrato original, as diluições e os grupos controles negativo com e sem células (Figura 5). As placas foram levadas à estufa a 37° C onde permaneceram por 24 horas, até o momento da colocação do meio de cultura condicionado. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, 12 espécimes para cada grupo experimental.

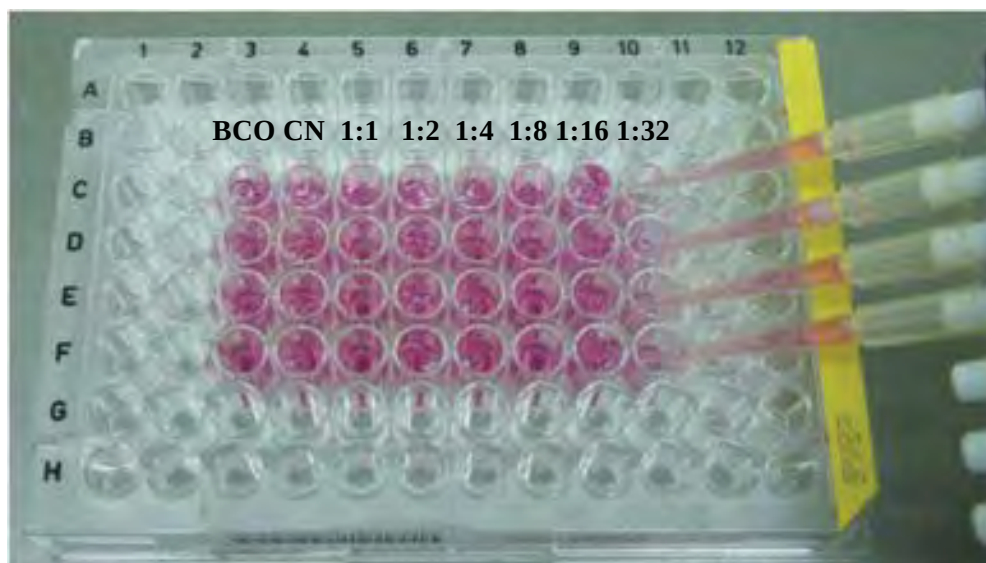


Figura 5 – Plaqueamento da suspensão celular em placa de 96 poços (5×10^3 células/poço). BCO) sem células; CN) com células; 1:1 - 1:32) diluições.

4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular

A curva padrão de viabilidade e crescimento celular foi obtida através da avaliação das células cultivadas em placas de 96 poços sem aplicação dos tratamentos em teste. A partir do levantamento feito na literatura do número de células V79 utilizadas, foi realizado o cultivo celular em uma sequência de 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 5×10^3 , 8×10^3 e 10×10^3 células por poço. Para a obtenção da curva de viabilidade, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com MTT nos períodos de 6, 12 e 24 horas.

No ensaio de MTT, por meio da quantificação da absorbância, os resultados deste teste mostrou numericamente uma curva de sobrevivência celular, onde o pico da curva refere-se ao número ideal de células a ser cultivadas que no presente estudo foi de 5×10^3 .

4.4 Preparação dos extratos originais e diluições

Para o ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade a resposta de fibroblastos pulmonares de hamster Chinês (V79) frente aos cimentos endodônticos foi analisada e para isso foram estabelecidos quatro grupos: AH Plus (Dentsply De Trey, Alemanha); EndoREZ (Ultradent, USA); RoekoSeal (Coltene Whaledent, Alemanha) e cimento experimental à base do óleo-resina da Copaíba. Os cimentos foram avaliados em três diferentes tempos após a manipulação: 0 h, 12h e 24h.

As composições destes materiais estão descritas na Tabela 1.

Os cimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante sob condições assépticas em capela de fluxo laminar para prevenir risco de contaminação bacteriana durante os testes de toxicidade. Os materiais foram acondicionados em poços da placa de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) de modo que o cimento ocupasse a área total do fundo do poço, de diâmetro 16,2 mm, e apresentasse 2 mm de altura. Para esta padronização, 0,22 mL de cimento foi colocado em cada poço com o auxílio de uma seringa de 1 mL (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA). Os espécimes do cimento EndoREZ tiveram seus poços cobertos com um êmbolo de seringa de 10ml envolto por película de Parafilm "M" para diminuir o contato com o oxigênio do ar e foram fotopolimerizados (780 mW/cm^2) por 40s. Os cimentos foram deixados em estufa (5% CO_2 a 37°C) por 12h e 24h.

Em seguida, os poços com cimentos logo após a manipulação (0h) e nos tempos 12h e 24h foram preenchidos com 2,5 mL de meio de cultura e as placas permaneceram em estufa a 37°C por 24h. Os extratos originais (1:1) foram preparados seguindo as recomendações da ISO 10993 em uma proporção de $82,4 \text{ mm}^2$ da área da superfície do espécime por mL de meio de cultura.

Tabela 1 – Composição dos cimentos endodônticos utilizados nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade.

Cimentos endodônticos	Composição
AH Plus (Dentsply De Trey, Alemanha)	Pasta A: Bisphenol-A, Bisphenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de óxido de ferro Pasta B: dibenzylldiamina, aminoadamantane, diamina tricyclodecane, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óleo de silicone
EndoREZ (Ultradent, USA)	30% UDMA, óxido de zinco, sulfato de bário, resinas, pigmentos
RoekoSeal (Coltene Whaledent, Alemanha)	Polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óleo à base de parafina, catalisador de platina, dióxido de zircônio
Cimento experimental à base do óleo-resina da Copaíba	Pó: óxido de zinco, hidróxido de cálcio, subcarbonato de bismuto, resina natural (breu), bórax Líquido: óleo-resina da Copaíba

Após este período, 2,5 mL do meio que estavam em contato com os cimentos foram removidos de cada poço (Figura 6b) e colocados em tubo falcon, devidamente identificado com tempo e cimento, formando os extratos originais (1:1) de cada material e congelados a temperatura de -80°C.

Para a realização das diluições, os extratos originais foram descongelados em temperatura ambiente. Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados 2,4 mL de extrato original e para o teste cometa foram utilizados 4 mL para cada placa. Para cada extrato original foram realizadas cinco diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), onde metade da quantidade do extrato original foi diluído em mesma quantidade de meio de cultura contido em tubo falcon, formando a diluição 1:2. As

diluições seguintes foram realizadas da mesma forma, metade da quantidade da diluição 1:2 foi diluída em mesma quantidade de meio de cultura para formar 1:4, e assim por diante até o preparo da diluição 1:32 (Figura 7).

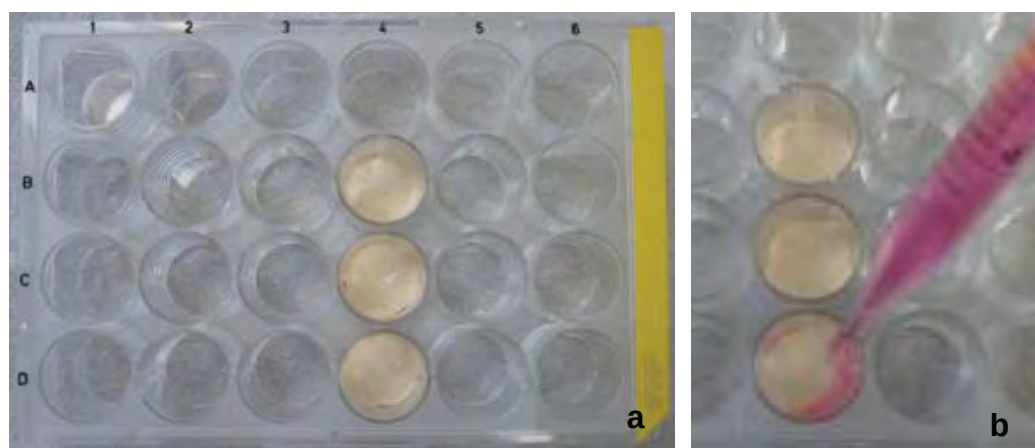


Figura 6 – a) espécimes do cimento RoekoSeal na placa de 24 poços; b) remoção de 2,5 mL de extratos de cada poço da placa de 24poços.

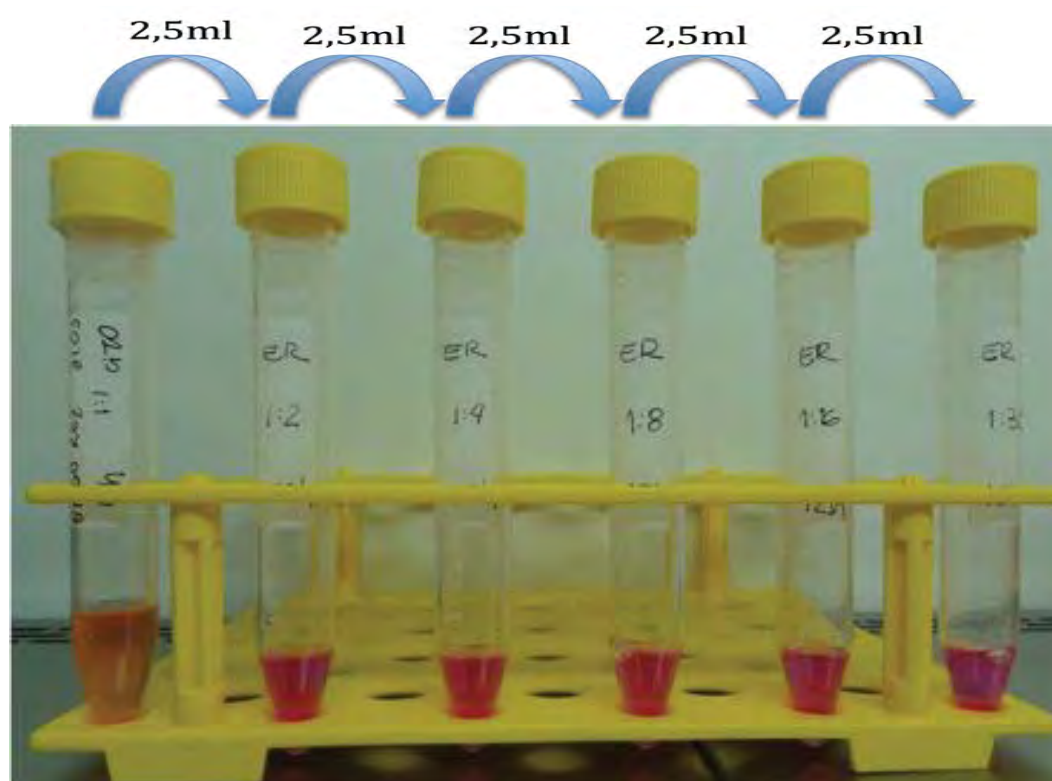


Figura 7 – Extrato original (1:1) e suas diluições (1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32) do cimento EndoREZ.

4.5 Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, os extratos originais e suas diluições foram colocados em contato com fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79).

Para o plaqueamento foi utilizada uma quantidade de 5×10^3 células, determinada pelo levantamento da curva padrão, em 200 μ L de meio de cultura, acondicionado em cada poço da placa de 96 poços e incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas a 200 μ L de diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) e dos extratos originais (1:1) dos materiais; 200 μ L de meio de cultura para o controle negativo (sem células - Branco) e 200 μ L de meio para o controle negativo (com células - CN) e incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24 h.

Após este período, a viabilidade celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinil desidrogenase (SDH). Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). As reações com o MTT são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação do NADH ou NADPH (formas reduzidas da nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada, respectivamente, que atuam na glicólise e no ciclo de Krebs) que reduzem o MTT.

O ensaio com MTT foi realizado com o preparo do reagente, diluindo-se 0,5 mg de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) (Figura 8a) em 1 mL de solução de PBS. Como essa solução é sensível a

luz, foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 100 μ L da solução de MTT foram adicionados em cada poço (Figura 8b). Cada placa foi então envolvida em papel alumínio e permaneceu na estufa por uma hora. Após este período, o MTT foi removido e foram adicionados 100 μ L de DMSO (Figura 8c) em cada poço, permanecendo na estufa por 10 minutos. Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado por mais 10 minutos e as placas foram levadas à leitora (Asys Hitech GmbH, Áustria) previamente programada (Figura 8d). A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância foram submetidos à análise quanto à porcentagem de viabilidade celular pela atividade mitocondrial das células e foi feita uma comparação quanto à viabilidade celular após a aplicação de cada controle.

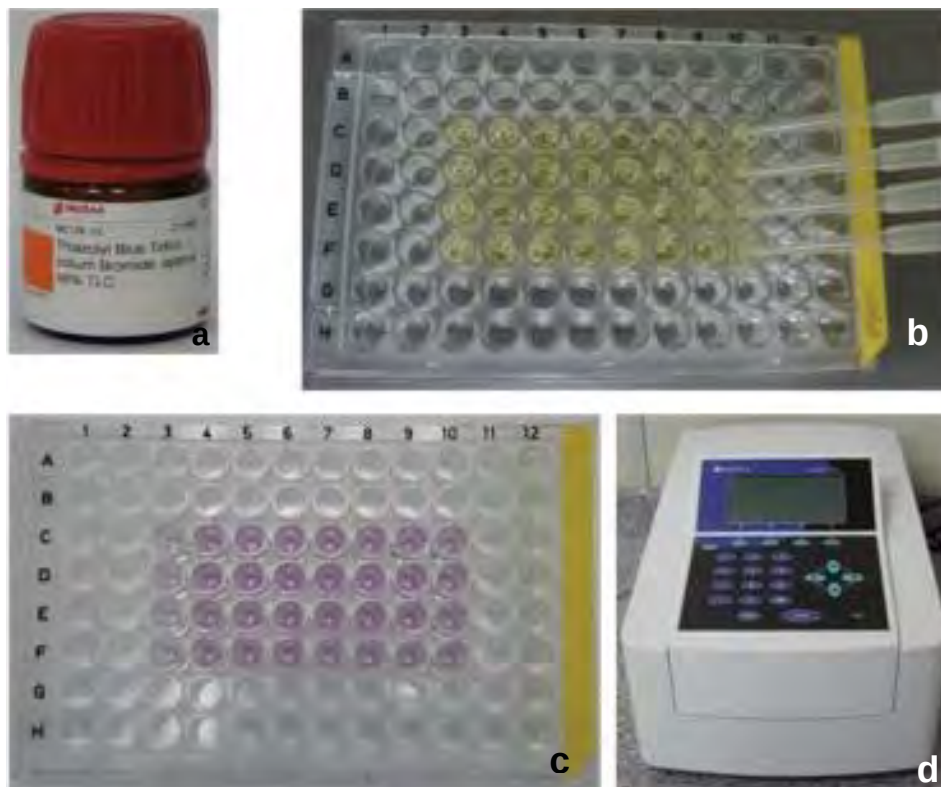


Figura 8 – a) frasco de MTT; b) aplicação da solução de MTT; c) placa de 96 poços após aplicação de DMSO; d) espectrofotômetro 570 nm utilizado para leitura da placa;

4.6 Ensaio de genotoxicidade

Para o ensaio de genotoxicidade, fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79 - Banco de células do Rio de Janeiro-BCRJ) foram cultivados em frascos (75 cm³) em meio mínimo essencial (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e solução antibiótica-antimicótica a 1% (10.000 unidades de penicilina, 10mg de estreptomicina e 25µg de anfotericina B por ml em 0.9% cloreto de sódio; Sigma) em solução tampão fosfato salina (PBS) e incubadas em estufa a 37°C e umidade, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas antes do teste. Células confluentes foram destacadas com 3ml tripsina 0,15% por 5 minutos e, posteriormente, foi adicionado 6ml de meio e as células foram centrifugadas por 5 minutos utilizando-se 1000 rpm. A suspensão de células foi contada utilizando-se a câmara de Neubauer (Herka, Berlin, Germany) e foram semeadas 3×10^5 células em placas de 6 poços.

De acordo com os valores de viabilidade encontrados no ensaio de citotoxicidade, foram selecionadas para o teste cometa, as diluições provenientes e os extratos originais (1:1) que apresentaram valores em torno de 50% de viabilidade celular (Tabela 2). Um grupo controle negativo foi tratado com meio de cultura (DMEM) e um grupo controle positivo foi estabelecido utilizando etilmetano sulfonato (EMS) (Sigma Aldrich Co. Alemanha) à concentração de 5 mM. Depois da incubação por 24 h a 37°C, as células foram centrifugadas por 5 minutos (1000rpm), resuspendidas com meio fresco (DMEM).

Tabela 2 - Tratamento das culturas celulares com diluições selecionadas para cada material e grupos controles.

Materiais		Diluições
Controle negativo		Meio de cultura
Controle positivo (EMS)		5mM
AH Plus	0h	1:16
	12h	1:8
	24h	1:16
Copaíba	0h	1:2
	12h	1:2
	24h	1:2
EndoRez	0h	1:16
	12h	1:8
	24h	1:8
RoekoSeal	0h	1:2
	12h	1:2
	24h	1:2

O protocolo que foi utilizado para o ensaio cometa seguiu as normas propostas por Tice et al. (2000). Um volume de 10µl de células experimentais ou controle ($\sim 1 \times 10^4$ células) (Figura 9a) foi adicionado em 120µl de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 37°C (Figura 9b), e depositado sobre uma lâmina microscópica previamente recoberta com 1,5% de agarose normal (Sigma Aldrich Co., Alemanha), depois de colocada a lamínula foram deixadas em refrigerador por 5 minutos. Depois da solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA - Sigma Aldrich, St. Louis, USA; 10 mM de solução tampão Tris-HCl pH = 10 – Sigma Aldrich, St. Louis, USA; 1% Triton X-100 – Sigma Aldrich, St. Louis, USA; e 10% de DMSO – Merck, St. Louis, USA) (Figura 10a) por 2 horas em refrigerador.



Figura 9 – a) Aplicação de 10 μ l de meio com células; b) Aplicação de 120 μ l de agarose 0,5%; c) Montagem com lamínula.

Antes da eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução tampão alcalina (0,3 mM de NaOH, Sigma Aldrich, St. Louis, USA; e 1 mM de EDTA, Sigma Aldrich, St. Louis, USA; pH > 13) (Figura 10b) por 20 minutos e receberam eletroforese por mais 20 minutos com 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA (Figura 11). Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas em 0,4 M de solução Tris-HCl (pH = 7,5) (Figura 10c) por 5 minutos, fixadas em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Germany) e estocadas em temperatura ambiente até o momento da coloração.

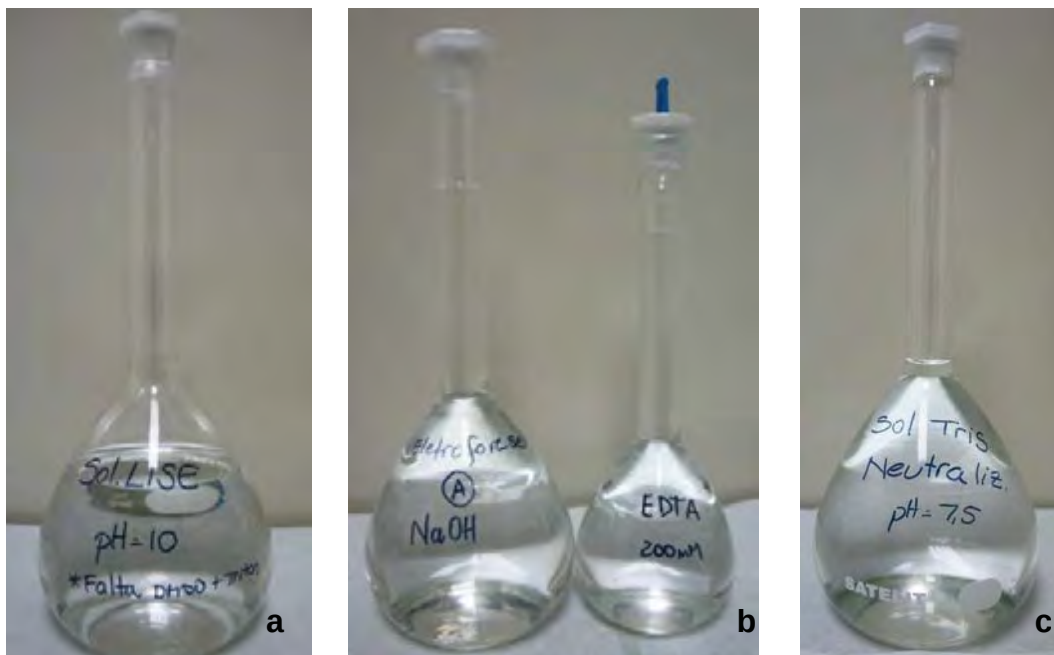


Figura 10 – a) Soluções: solução de Lise; b) solução de eletroforese: solução de NaOH + solução de EDTA; c) solução de neutralização (Tris).

Para a solução de coloração foi utilizado 0,5 μ l de corante de fluorescência-DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) em 2 ml de PBS. Dessa solução, 300 μ l foram colocados sobre as lâminas por 5 minutos em umidade relativa, após este tempo foram lavadas com água destilada e recobertas com lamínula fixada com Fluorshield com DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e seguiram para análise.



Figura 11 – Cuba de eletroforese 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA.

Duas lâminas de cada grupo foram analisadas, um total de 25 cometas foram capturados para cada lâmina e foram examinados utilizando um microscópio de fluorescência sob magnificação de 40X (Leica

Leitz, Germany) (Figura 12a) conectado a uma câmera fotográfica (Figura 12a). O sistema de análise de imagem computadorizada (Comet Assay IVTM v4.3, UK) adquiriu as imagens, computou a intensidade da integridade de cada célula, estimou os componentes da célula e então avaliou a taxa de parâmetros derivados (Figura 12b). As células que não sofreram dano ao material genético apresentaram núcleo intacto e sem cauda, e as células danificadas apresentaram aparência de um cometa. Para quantificar o dano do DNA o *tail moment* foi avaliado. O *tail moment* foi calculado como o produto da percentagem de DNA contido na cauda X comprimento da cauda dos cometas a partir do centro de gravidade da cabeça do cometa. O *tail moment* está correlacionado com o nível de quebra do DNA da célula. O valor médio do *tail moment* em uma amostra foi tido como o índice de dano do DNA daquela amostra.



Figura 12 - a) microscópio de fluorescência sob magnificação de 40X (Leica Leitz, Germany); b) Comet Assay IVTM v4.3, UK.

O dano ao DNA também foi classificado visualmente em 5 classes de acordo com o tamanho da cauda, (classe 0 - núcleo intacto a classe 4-máximo dano) (Collins *et al.*, 1995, 1997) (Figura 13).

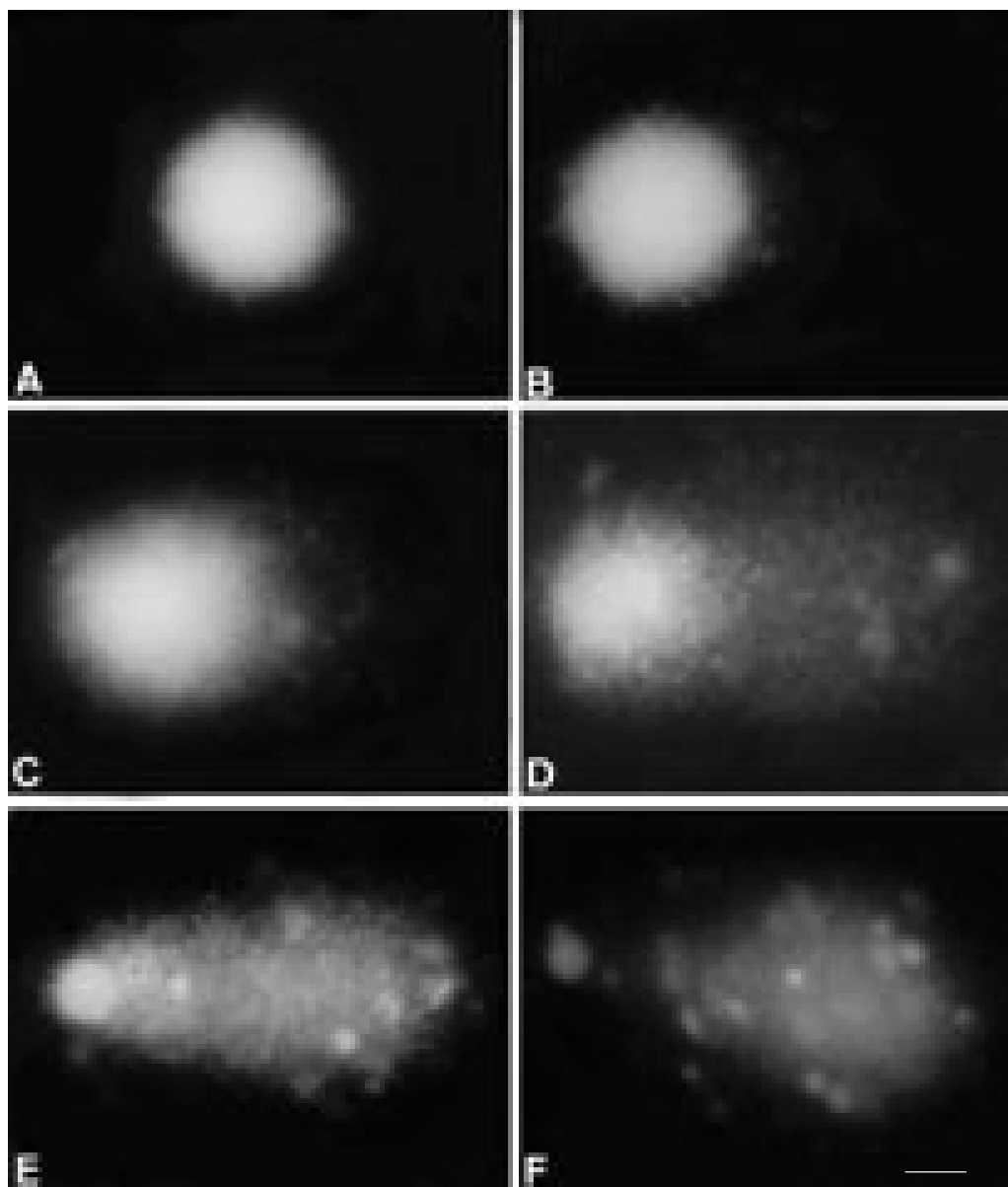


Figura 13 - A, Classe 0, sem danos; B, classe 1; C, classe 2; D, classe 3; E, classe 4, o máximo de dano; F, célula apoptótica. Bar = 10 μ m.

4.7 Análise Estatística

Os testes Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$) (MINITAB - Minitab, version 15, 2009 e STATISTIX for Windows - version 8.0, StatSoft

Inc, 2000) foram utilizados para as análises estatísticas das diferenças entre a sobrevivência celular, em culturas de células tratadas e não tratadas. Ainda, o valor médio do *tail moment* das amostras foi avaliado usando o teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade quanto a sobrevivência celular estão descritos na Figura 12 e Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7. As porcentagens de células sobreviventes de todos os materiais comparados ao grupo controle são mostradas nas Tabelas 3, 4 e 5.

A citotoxicidade dos extratos dos cimentos endodônticos em três diferentes tempos após manipulação, (0 h, 12 h e 24 h) foi determinada nas células V79 após um período de exposição de 24h utilizando-se o teste de MTT. Quase todos os materiais testados foram citotóxicos exceto o cimento RoekoSeal, contudo os efeitos apresentaram grande variabilidade entre as diferentes diluições e tempos. As porcentagens de células viáveis, diante das diferentes diluições dos materiais após os testes, estão expressas nas Tabelas 3, 4 e 5 e Figura 12.

Logo após a manipulação dos cimentos, período 0 hora, os cimentos EndoREZ e AH Plus foram os mais tóxicos dos materiais testados, sendo que o AH Plus foi mais tóxico que o EndoREZ nas diluições 1:8 (37,27%), 1:16 (59,17%) e 1:32 (75,52%), tendo diferença estatística apenas na diluição 1:32 em que o EndoREZ apresentou 93,81% de viabilidade celular. Neste mesmo período, o cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba reduziu a sobrevivência celular a 17,52% nos extratos originais, apresentando um crescimento na viabilidade celular de 70,63% na diluição 1:2, apresentando-se semelhante ao grupo controle a partir da diluição 1:8. O cimento

RoekoSeal promoveu os melhores resultados exibindo 100,19% de sobrevivência celular nos extratos originais.

Tabela 3 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre V79, expressado em porcentagem de células viáveis logo após a manipulação (0h). Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil

0 HORA				
Diluições	AH PUS	ENDOREZ	COPAÍBA	ROEKOSEAL
controle	100	100	100	100
1:32	75,52 (63,9 – 86,1)	93,81 (91,5 – 120,9)	110,6 (102,5 - 126,7)	104,14 (99,8 - 121,6)
1:16	59,17 (51,1 – 62,6)	67,75 (59,2 – 72,1)	120,38 (101,4 - 125,6)	100,99 (94,1 - 107,7)
1:8	37,27 (35,2 - 41,7)	43,44 (42,1 - 45,6)	94,49 (74,4 - 104,1)	98,06 (92,0 - 102,7)
1:4	14,34 (12,0 - 15,4)	27,29 (19,4 – 28,7)	87,38 (80,0 - 94,5)	97,24 (88,5 - 102,3)
1:2	4,48 (4,1 - 5,6)	0,81 (0,4 - 1,9)	70,63 (67,7 - 76,4)	95,11 (88,9 - 96,7)
1:1	0,31 (0,3 - 1,0)	0,89 (0,3 - 1,3)	17,52 (13,2 - 23,2)	100,19 (95,6 - 101,58)

% de sobrevivência celular: Mediana (25% - 75% percentil)

No tempo de endurecimento 12 horas, o cimento EndoREZ foi o mais tóxico dos materiais testados, reduzindo a sobrevivência celular a 1,09% no extrato original, 23,54% na diluição 1:4, 41,95% na diluição 1:8 e 75,59% na diluição 1:32. Na sequência, o cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba reduziu a sobrevivência celular a 0,69% nos extratos originais e 60,41% na diluição 1:2. O cimento AH Plus reduziu a sobrevivência celular para 5,75% nos extratos originais e 61,89% na diluição 1:2. Finalizando com o RoekoSeal que promoveu os melhores resultados exibindo 101,41% de sobrevivência celular nos extratos originais.

Tabela 4 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre V79, expressado em porcentagem de células viáveis, no tempo de endurecimento 12h. Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil

12 HORAS				
Diluições	AH PLUS	ENDOREZ	COPAÍBA	ROEKOSEAL
controle	100	100	100	100
1:32	112,63 (101,2 - 154,3)	75,59 (61,5 - 83,8)	111,39 (103,4 - 153,2)	102,92 (88,4 - 123,8)
1:16	108,50 (84,5 - 163,4)	59,00 (52,9 - 64,2)	102,14 (95,1 - 120,0)	102,33 (94,9 - 105,8)
1:8	103,58 (78,0 - 127,3)	41,95 (37,9 - 50,2)	106,7 (94,5 - 233,7)	98,57 (90,3 - 109,2)
1:4	94,48 (84,8 - 107,1)	23,54 (21,6 - 23,5)	89,60 (85,1 - 154,5)	101,97 (97,5 - 106,9)
1:2	61,89 (41,2 - 77,4)	0,72 (0,5 - 1,1)	60,41 (57,0 - 64,3)	101,25 (95,7 - 114,6)
1:1	5,75 (2,5 - 8,8)	1,09 (0,8 - 1,1)	0,69 (0,3 - 0,9)	101,41 (92,8 - 108,2)
% de sobrevivência celular: Mediana (25% - 75% percentil)				

Já no tempo de endurecimento 24 horas, os cimentos AH Plus, EndoREZ e Copaíba foram severamente citotóxicos nas concentrações originais reduzindo a sobrevivência celular a 1,39%, 1,08% e 1,13%, respectivamente. Porém, a partir da diluição 1:2 o cimento experimental a base de Copaíba melhorou a sobrevivência celular em 64,69%, chegando a resultados semelhantes ao controle na diluição 1:8 (99,79%). Enquanto que os cimentos AH Plus e EndoREZ só apresentaram viabilidade celular maior que 50% a partir da diluição 1:8 (51,32% e 54,59%, respectivamente) e na diluição 1:32 obtiveram resultados semelhantes ao grupo controle. O RoekoSeal promoveu os melhores resultados exibindo 91,40% de sobrevivência celular nos extratos originais.

Tabela 5 - Efeito da citotoxicidade dos materiais sobre V79, expressado em porcentagem de células viáveis, no tempo de endurecimento 24h. Os valores indicados são medianas, 25% e 75% percentil

24 HORAS				
Diluições	AH PUS	ENDOREZ	COPAÍBA	ROEKOSEAL
controle	100	100	100	100
1:32	110,32 (69,8 - 137,4)	91,77 (83,8 - 109,5)	111,03 (104,4 - 118,9)	95,57 (83,5 - 153,8)
1:16	81,94 (56,4 - 103,2)	82,01 (71,5 - 94,5)	104,66 (97,8 - 108,3)	87,65 (79,1 - 145,4)
1:8	51,32 (25,6 - 71,1)	54,59 (42,1 - 61,9)	99,79 (95,3 - 106,6)	99,75 (94,3 - 131,1)
1:4	1,39 (0,1 - 2,3)	38,28 (31,5 - 43,1)	90,11 (85,5 - 95,7)	89,47 (78,9 - 136,7)
1:2	1,17 (0,6 - 3,5)	0,32 (0,3 - 0,9)	64,69 (60,8 - 75,8)	91,55 (86,5 - 95,8)
1:1	1,39 (0,9 - 2,3)	1,08 (0,3 - 1,3)	1,13 (0,8 - 2,2)	91,40 (88,0 - 97,4)
% de sobrevivência celular: Mediana (25% - 75% percentil)				

Tabela 6 – Dunn (5%) para as diluições de todos os materiais seguindo o tempo de endurecimento dos cimentos (0, 12 e 24 h)

	Materiais	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
0 hora	AH Plus	B	B C	B	B	B	B
	EndoREZ	B	C	B	B	B	A
	Copaíba	A	A B	A	A	A	A
	RoekoSeal	A	A	A	A	A	A
12 horas	AH Plus	A B	B	A B	A	A	A
	EndoREZ	B C	C	C	B	B	B
	Copaíba	C	B	B	A	A	A
	RoekoSeal	A	A	A	A	A	A
24 horas	AH Plus	B	B	B	B	B	A
	EndoREZ	B	B	B	B	B	A
	Copaíba	B	A	A	A	A	A
	RoekoSeal	A	A	A	A	A B	A

* Letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 7 – Dunn (5%) para as diluições e os diferentes tempos de endurecimento de cada material

Materiais		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
AH Plus	0 hora	B	B	B	B	B	B
	12 horas	A	A	A	A	A	A
	24 horas	A B	B	C	B	A B	A B
EndoREZ	0 hora	A	A	B	A	A B	A
	12 horas	A	A	B	A	B	B
	24 horas	A	A	A	A	A	A
Copaíba	0 hora	A	A	A	A	A	A
	12 horas	B	B	A	A	B	A
	24 horas	B	A B	A	A	A B	A
Roeko Seal	0 hora	A	A B	A	A	A	A
	12 horas	A	A	A	A	A	A
	24 horas	A	B	A	A	A	A

* Letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

As diferenças estatísticas entre os materiais nas diferentes diluições e diferentes tempo de endurecimento estão expressas nas Tabelas 6 e 7. A influência dos extratos dos materiais na sobrevivência celular pode ser classificada da maior toxicidade para a menor seguindo: EndoREZ > AH Plus > Copaíba > RoekoSeal, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos, Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

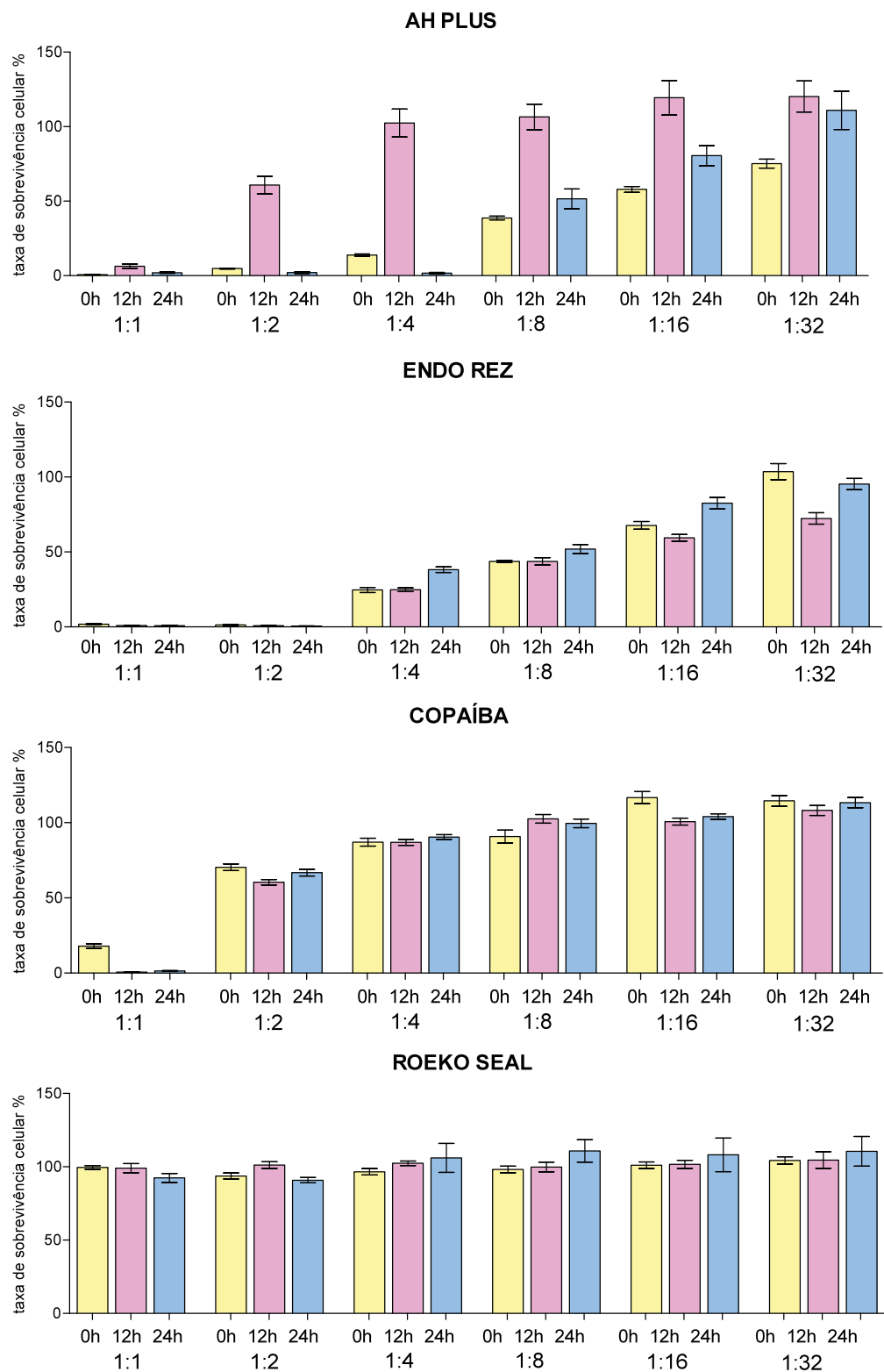


Figura 14 - Citotoxicidade dos materiais em V79 após a exposição às diluições.

5.2 Teste cometa

O dano ao DNA, foi classificado em 5 classes de acordo com o tamanho da cauda (classe 0 - núcleo intacto a classe 4 - máximo dano) (Figura 13).

Os danos ao DNA pelos materiais endodônticos testados foram analisados em cultura de células V79. Foram contados 25 cometas por amostra (Figuras 15 a 28).

A maioria dos danos visualizados ao DNA nos três períodos, foram de classe 1 e 2, com exceção RoekoSeal que no período de 24h apresentou uma cauda de classe 3.

Somente as diluições que obtiveram viabilidade celular próxima a 50%, determinada pelo ensaio de MTT foram contadas (Tabela 2). As diluições mais citotóxicas foram descartadas, pois não permitiram proliferação celular ou causaram apoptose das células existentes não sendo possível realizar contagem de cometas e avaliar os possíveis efeitos genotóxicos.

Quase todos os materiais estudados causaram danos ao DNA celular com exceção do RoekoSeal no período 0h, EndoREZ no período 0h, Copaíba nos períodos 12h e 24h e AH Plus no período 12h (Tabela 8 e Figura 29). As diluições dos cimentos EndoREZ e RoekoSeal no período 24h foram as que mais causaram danos ao DNA celular, sendo que somente o EndoREZ obteve diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Tabela 8 – Mediana e percentuais 25% e 75% de dano ao DNA celular (*tail moment*) em células V79 expostas as diluições dos materiais em três períodos (0h, 12h e 24h)

Materiais	Tempo/ diluições		Mediana	25%	75%
Controle			0.11	0.06	0.27
AH Plus	0h	1:16	0.10	0.01	1.65
	12h	1:8	0.01	0.00	0.11
	24h	1:16	0.04	0.01	0.37
Copaíba	0h	1:2	0.05	0.01	0.78
	12h	1:2	0.03	0.02	0.50
	24h	1:2	0.02	0.00	0.15
EndoREZ	0h	1:16	0.03	0.00	0.21
	12h	1:8	0.04	0.01	0.83
	24h	1:8	0.99	0.05	1.98
RoekoSeal	0h	1:1	0.12	0.01	0.53
	12h	1:1	0.50	0.01	1.06
	24h	1:1	0.30	0.05	0.75
EMS			0.16	0.02	0.51



Figura 15 – Imagem de célula V79 após tratamento com grupo controle negativo (Meio de cultura) (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

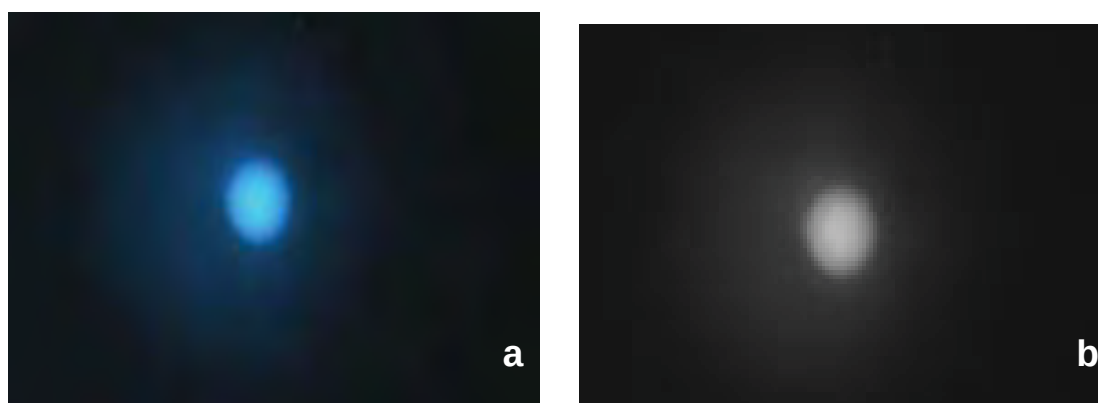


Figura 16 – Imagem de célula V79 após tratamento com grupo controle positivo (EMS) (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

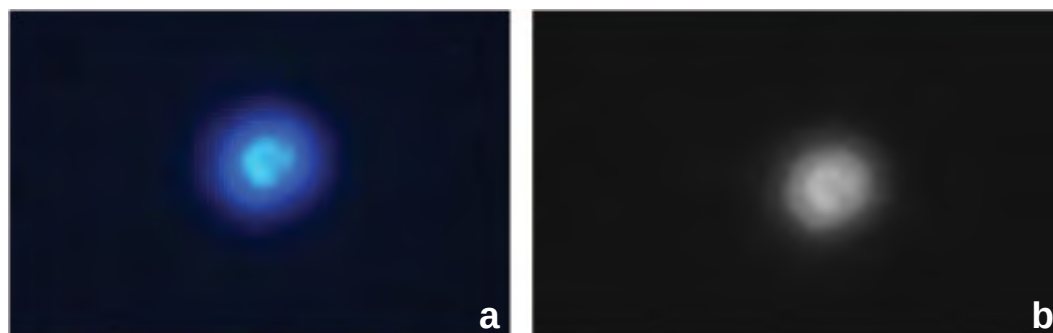


Figura 17 - Imagem de célula V79 após tratamento com AH Plus 0 h (1:16) (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.



Figura 18 – Imagem de célula V79 após tratamento com AH Plus 12 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

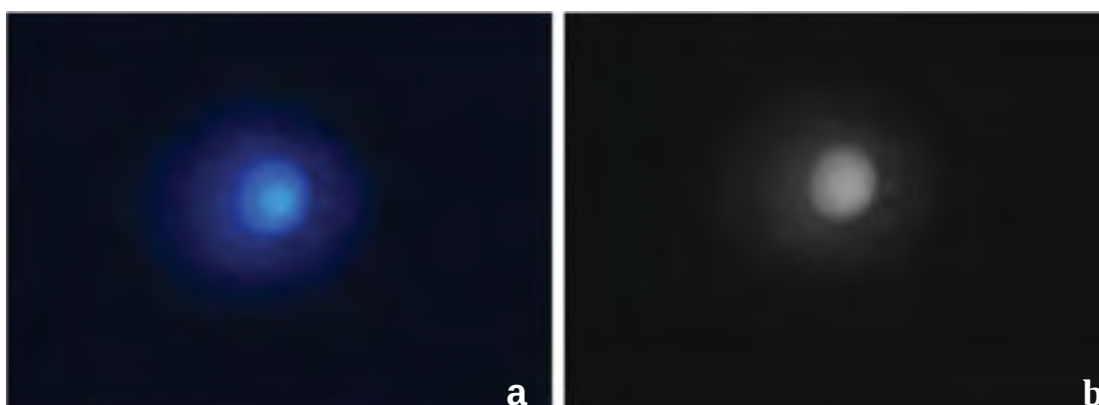


Figura 19 – Imagem de célula V79 após tratamento com AH Plus 24 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

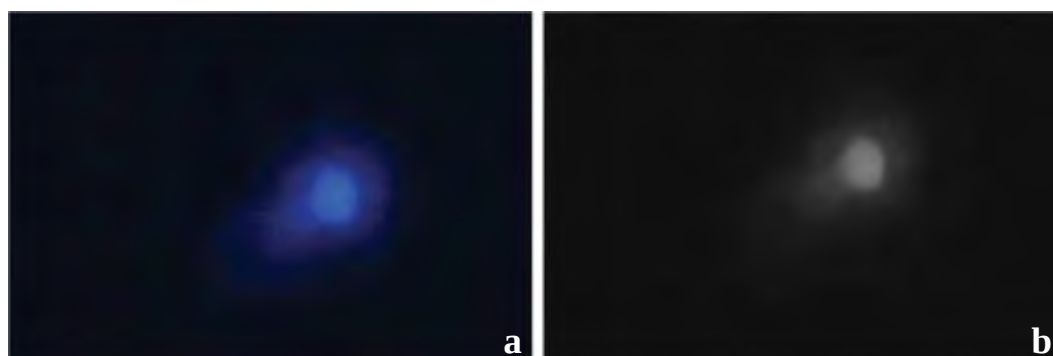


Figura 20 - Imagem de célula V79 após tratamento com cimento experimental à base de Copaíba 0 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

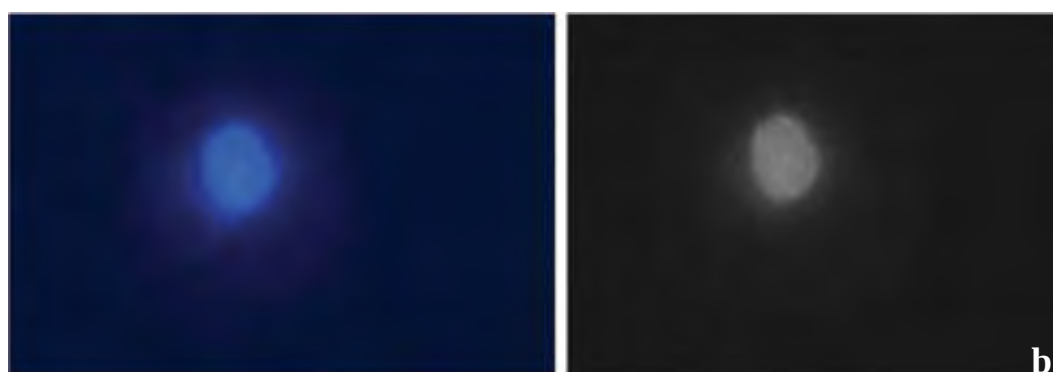


Figura 21 - Imagem de célula V79 após tratamento com cimento experimental à base de Copaíba 12 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

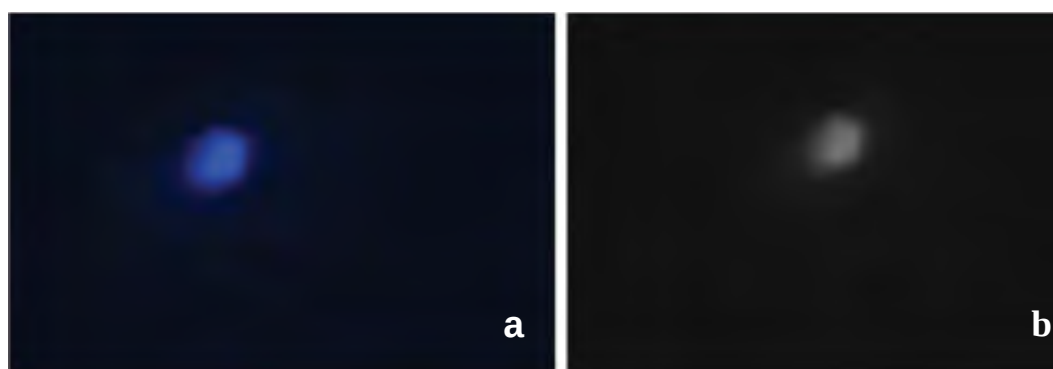


Figura 22 - Imagem de célula V79 após tratamento com cimento experimental à base de Copaíba 24 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

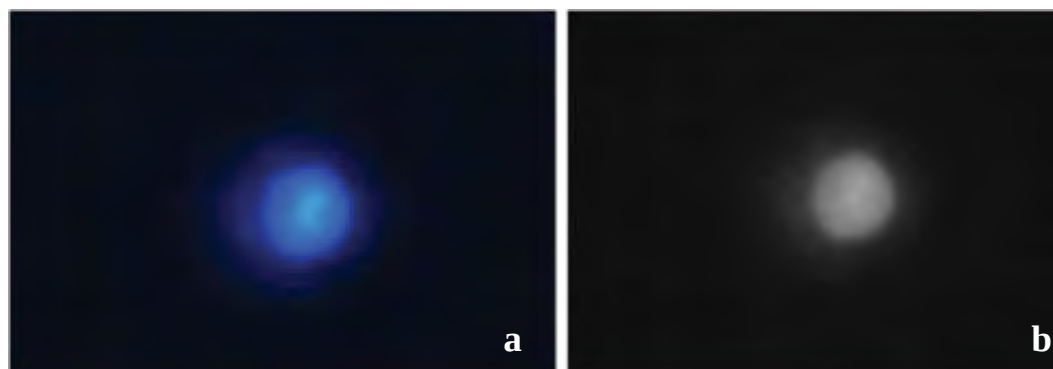


Figura 23 - Imagem de célula V79 após tratamento com Endo Rez 0 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

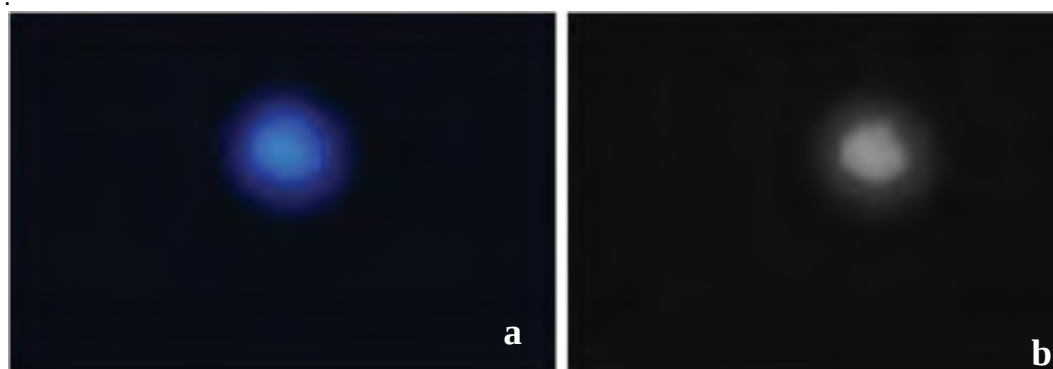


Figura 24 - Imagem de célula V79 após tratamento com Endo Rez 12 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

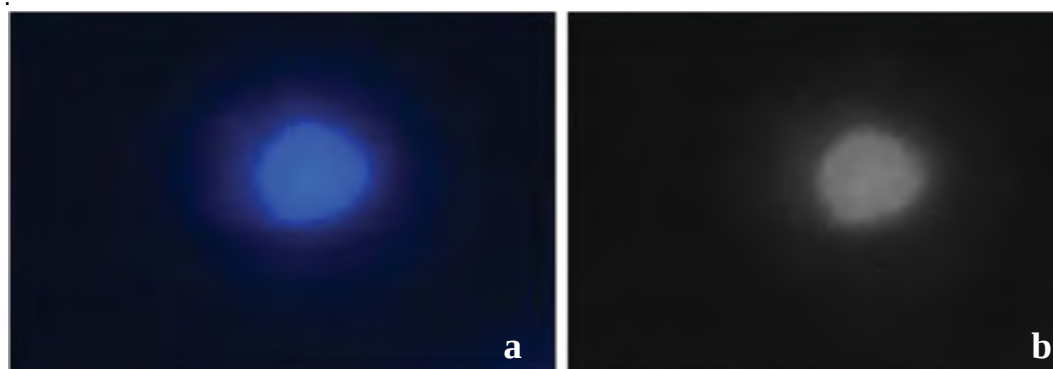


Figura 25 - Imagem de célula V79 após tratamento com Endo Rez 24h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

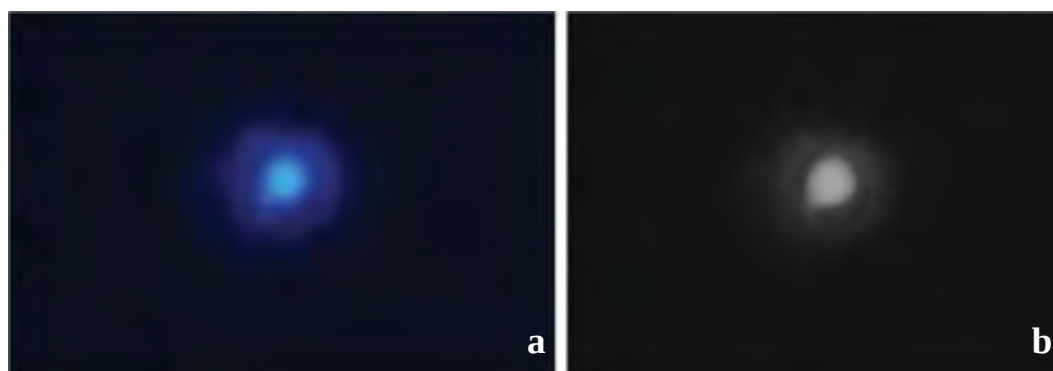


Figura 26 - Imagem de célula V79 após tratamento com RoekoSeal 0 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

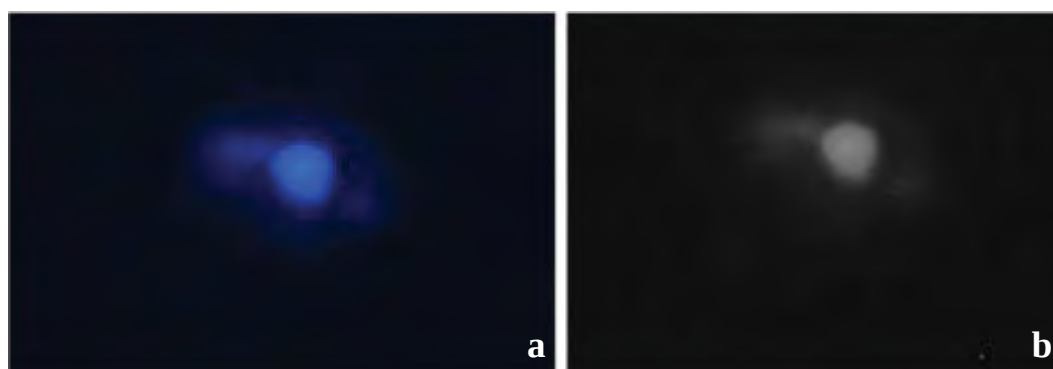


Figura 27 - Imagem de célula V79 após tratamento com RoekoSeal 12 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

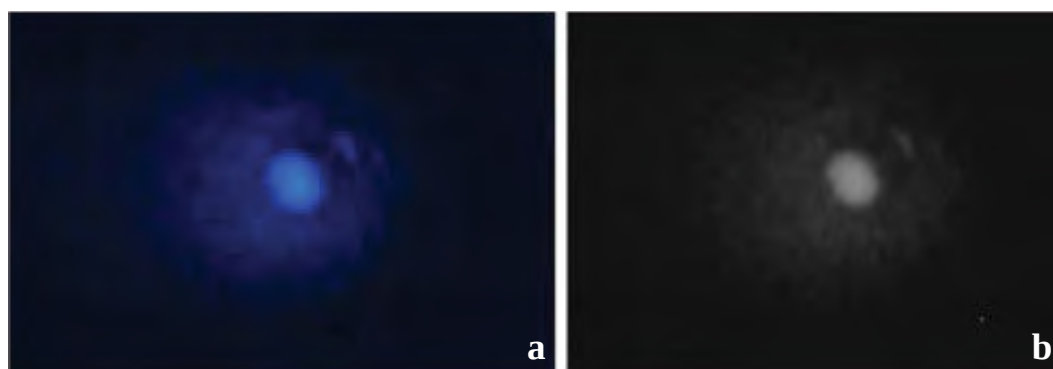


Figura 28 - Imagem de célula V79 após tratamento com RoekoSeal 24 h (aumento 40x); a) imagem da coloração com DAPI; b) imagem branco-preta.

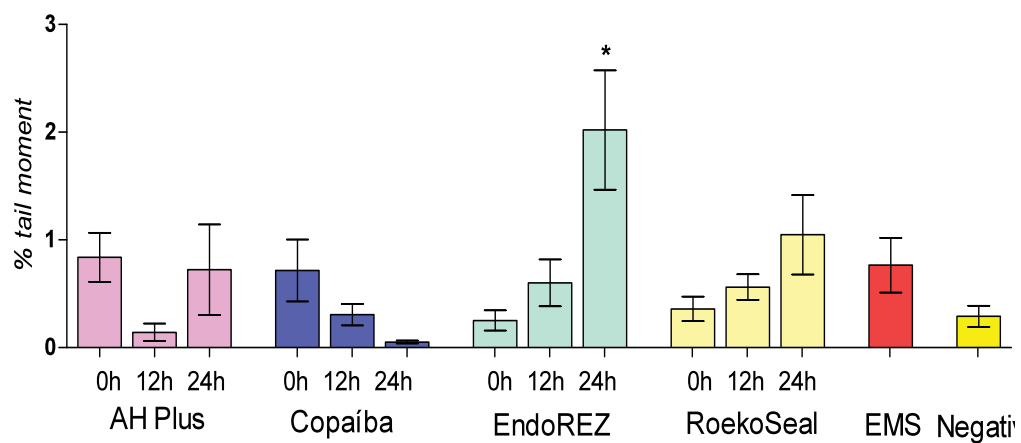


Figura 29 – Danos ao DNA em células V79 após a exposição aos materiais em diferentes diluições. As barras representam as medianas (25-75% percentil) e as medianas dos danos ao DNA foram calculadas em relação ao grupo controle negativo. Diferenças estatisticamente significante entre o grupo controle negativo e os grupos tratados são indicadas com asteriscos.

6. Discussão

6.1 Discussão da Metodologia

Ao selecionar um material para o tratamento endodôntico, a biocompatibilidade é uma das propriedades desejáveis (Al-Hiyasat et al., 2010).

A impermeabilização do sistema de canais radiculares por meio de materiais biologicamente compatíveis continua sendo uma das metas das pesquisas em Endodontia. Mesmo com as técnicas mais modernas de instrumentação e obturação, em algumas situações torna-se difícil evitar um discreto extravasamento do material obturador. Nesse caso, foi despertada a necessidade de estudos mais aprofundados quanto ao comportamento biológico, sem desfavorecer as propriedades físicas e químicas, tentando-se encontrar algum cimento obturador que venha satisfazer tanto aos anseios dos profissionais que trabalham diariamente em clínica como aos pesquisadores da área afim (Senne et al., 2009).

Para assegurar a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos, vários métodos de pesquisa têm sido usados para avaliar seu comportamento biológico. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para analisar viabilidade ou sobrevivência de células são relevantes e satisfatórios para a avaliação de propriedades biológicas básicas de materiais dentários, sendo uma análise de menor custo e de maior reprodutibilidade do que um teste executado em animais (Camps e About, 2003; Souza et al., 2006) e ainda permitem avaliar os complexos mecanismos homeostáticos que ocorrem *in vivo* (Ribeiro et al., 2005). Além disso, o experimento realizado *in vitro* tem como vantagens a

facilidade no controle dos fatores experimentais que são freqüentemente um problema em experimentos *in vivo* (Hensten-Pettersen, 1988; Scelza et al., 2001; Camps e About 2003). Entretanto, é extremamente importante combinar os resultados dos estudos *in vitro* e *in vivo* para entender os efeitos dos cimentos endodônticos nos tecidos apicais.

Neste estudo foram utilizados dois experimentos *in vitro*, sobre um modelo de cultura celular, que constituem testes iniciais para a avaliação de materiais empregados na Odontologia. Neste estudo, a citotoxicidade e a genotoxicidade foram avaliadas por meio do teste de MTT para análise de sobrevivência celular e pela detecção da quebra do DNA celular, mensurando o dano causado sobre o material genético.

Diferentes tipos de células podem ser utilizados para estes tipos de análise, sendo que estas podem ser provenientes de linhagens imortalizadas ou de linhagens primárias (Schmalz, 1994; Freshney, 2000). Linhagens celulares permanentes são estáveis, apresentam características biológicas bem definidas e podem ser obtidas a partir de coleções de cultura celulares (Schuster et al., 2001; Galler et al., 2006). Os fibroblastos são as células mais utilizadas para o estabelecimento de linhagens celulares permanentes, pois são células diplóides que tem tendência para se tornarem aneuplóides quando cultivadas por um longo período de tempo, originando assim culturas contínuas (Castro-Silva, 2004). Além disso, estas células têm capacidade de diferenciação em múltiplos tipos celulares, sendo, portanto utilizadas em estudos de citotoxicidade de diversos compostos (Freshney, 2000).

No presente estudo, foi utilizado fibroblastos de hamster Chinês (V79) que são pertencentes a uma linhagem de células previamente estabelecida e estão disponíveis comercialmente. Estas células são indicadas para analisar o comportamento biológico de materiais dentários, devido suas características celulares estáveis, bem definidas em condições experimentais e sua relevância para análise *in vitro* envolvendo estes materiais (Huang e Chang, 2002; Tai et al., 2001).

Além disso, é uma linhagem geneticamente idêntica o que propicia experimentos reproduzíveis e padronizados (Huang e Chang, 2002).

Em diversos estudos (Bouillaguet et al., 2004; Cavalcanti et al., 2005; Lodiene et al., 2008; Camargo et al., 2009; Karapinar-Kazandag et al., 2011) e no presente estudo, a citotoxicidade e genotoxicidade de materiais dentários foi mensurada utilizando extratos obtidos a partir destes materiais, ou seja, pelo contato indireto. Desta forma, os espécimes são preparados e colocados em uma solução na qual os materiais são capazes de liberar suas substâncias formando extratos (Schmalz, 1994). Assim, a análise de substâncias liberadas pelos materiais durante o tempo de endurecimento, presa ou polimerização pode ser avaliada (Cavalcanti et al., 2005). Clinicamente, os materiais dentários são inseridos dentro da cavidade recém manipulados, com endurecimento incompleto e provavelmente após a aplicação clínica, respostas locais são provocadas pelos componentes não reagidos ou parcialmente reagidos destes materiais. Após o completo endurecimento ainda é possível que constituintes potencialmente tóxicos possam ser liberados destes materiais obturadores (Huang e Chang, 2002). Portanto, uma situação clínica também pode ser mimetizada, já que o tempo para endurecimento ou polimerização dos materiais é realizado em ambiente úmido, permitindo que o estudo seja ainda mais clinicamente relevante (Cavalcanti et al., 2005).

Eldeniz et al. (2007) relatam que quanto mais fresco o cimento é colocado para a obtenção do extrato, maior é a citotoxicidade, e mais próximos da realidade são os resultados, uma vez que, clinicamente, os cimentos são colocados imediatamente após a manipulação. Entretanto, a avaliação de longos períodos após a manipulação dos cimentos também é importante para observar as mudanças e a possível diminuição da citotoxicidade.

No presente estudo os espécimes dos materiais foram preparados e padronizados de acordo com as normas da ISO (1992) que

propõe a padronização dos espécimes na relação área/volume de 50 a 600mm²/mL em que a superfície do material em contato com o meio de cultura permite a liberação de substâncias pelo material durante o seu tempo de endurecimento. No presente estudo foi utilizada a relação 82,4mm²/mL, sendo que os espécimes foram preparados nos tempos 0h, 12 h e 24h após a manipulação, foram colocados em contato com o meio de cultura, para que fossem avaliados os períodos imediato, intermediário e de possível endurecimento dos cimentos em contato com o organismo.

O ensaio com o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) vem sendo utilizado como um teste de citotoxicidade *in vitro* em culturas celulares devido sua rapidez e objetividade. O princípio desse teste baseia-se na capacidade das células viáveis em reduzirem o sal do MTT em seu metabolismo mitocondrial. Esse sal reduzido adquire uma coloração roxa, que pode ser mensurada em espectrofotômetro utilizando-se um leitor de Elisa (Kim et al., 2007). Este ensaio foi utilizado por muitos autores com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de diversos materiais para aplicação na Odontologia (Huang et al., 2002b; Lodiene et al., 2008; Al-Hiyasat et al., 2010), sendo também o teste de escolha para a realização do presente estudo, por oferecer resultados bastante precisos, sendo sensível a pequenas alterações no metabolismo celular.

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* mais utilizados são o teste de células individualizadas em gel de agarose (ou teste do cometa) (Ribeiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2006) e o teste de micronúcleo (Schweikl & Schmalz 2000; Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

O teste do cometa (ou single-cell gel) é capaz de detectar quebra do DNA celular permitindo a mensuração do dano causado sobre o material genético, sendo uma técnica de citogenética mais sensível, além de ser simples, de baixo custo e rápido.

Através deste método foi possível detectar o nível de danos no DNA em linfócitos primários resultantes da interação direta de

monômeros com DNA ou devido ao estresse oxidativo induzido em células tratadas (Collins, 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que o ensaio de cometa é uma ferramenta adequada para investigar genotoxicidade de compostos utilizados na prática odontológica (Ribeiro et al. 2004a, 2005). Neste estudo, optou-se pela realização do teste de cometa para a análise de possíveis danos ao DNA de células V79 quando expostas a diferentes cimentos endodônticos.

O EMS foi utilizado como controle positivo no teste cometa do presente estudo, pois é um material que comprovadamente causa grande indução de formação de micronúcleos nas células V79, denotando sua capacidade de causar dano ao DNA celular e, portanto, sendo considerado um material altamente genotóxico (Schweikl e Schmalz, 2000; Camargo et al., 2009a).

6.2 Discussão dos Resultados

As substâncias as quais compõem os materiais obturadores dos canais radiculares podem manter contato com os tecidos adjacentes ao ápice radicular, em um contato direto, no caso de um extravasamento do cimento obturador, ou ainda devido à difusão dos produtos da degradação destas substâncias por meio de numerosas conexões, como os túbulos dentinários, a rede de canais radiculares, canais acessórios, canais laterais, foraminas e forame apical. Diante deste fato, a propriedade biológica destes materiais é de grande relevância, uma vez que a permanência de um material citotóxico pode resultar em danos celulares dos tecidos adjacentes ao ápice radicular. Para alguns autores, apenas cimentos endodônticos que não possuam propriedades citotóxicas *in vitro* deveriam ser indicados na prática odontológica (Al-Hiyasat et al., 2010), contudo se ao menos estes

cimentos propiciassem uma mínima ação citotóxica e que esta ação fosse transitória e não perdurasse por longos períodos, já seria de grande valia para seu uso na prática endodôntica.

A citotoxicidade dos quatro cimentos endodônticos testados neste estudo apresentou diferenças significantes entre as diluições. O RoekoSeal, um cimento à base de silicone, foi o menos citotóxico sobre células V79, mantendo um excelente padrão de sobrevivência celular em todas as diluições, não apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo controle e na citotoxicidade entre os tempos avaliados.

Resultados semelhantes foram relatados em um estudo *in vitro* onde o RoekoSeal não teve efeito citotóxico sobre células de fibroblastos de ratos L929 e células humanas de carcinoma cervical (HeLa) e em nenhum dos diferentes tempos estudados (1, 24, 48h, 7dias e 1 mês). Além disso, os autores acreditam que o RoekoSeal pode ser promissor na busca de materiais endodônticos biocompatíveis (Miletic et al., 2005).

Silva-Herzog et al. (2011) avaliaram o cimento endodôntico Roeko Seal, comparado ao AH Plus e Sealapex, por meio da resposta inflamatória tecidual, chegando a resultados satisfatórios quanto a biocompatibilidade deste cimento que não provocou resposta inflamatória após 14 dias de experimento.

Os resultados de Eldeniz et al. (2007) mostram menor citotoxicidade do Roeko Seal sobre duas culturas celulares (fibroblastos de rato L929 e cultura primária de fibroblastos de gengiva humana HGF), avaliado por ensaio de MTT, quando comparado aos cimentos RC Sealer, Epiphany, EndoREZ, GuttaFlow, Acroseale, Apexit e AH Plus, em dois tempos diferentes, logo após a manipulação e depois de 7 dias de endurecimento, porém não encontrando diferença significativa estes períodos.

Outros estudos também estão de acordo com estes resultados (Schwarze et al., 2002; Oztan et al., 2003; Bouillaguet et al., 2006; Susini et al., 2006, Lodiene et al., 2008; Karapinar-Kazandag et al.,

2011). Contudo há pouca informação quanto as propriedades físicas deste cimento uma vez que o mesmo, por se tratar de um silicone, é elástico e pode se desprender das paredes do canal em preparos para pino em baixa rotação. Segundo Flores et al. (2010), o RoekoSeal tem seu endurecimento em aproximadamente 40 minutos, contrai 1,33% e apresenta 0,50% de solubilidade em média.

Neste estudo, de acordo com as comparações entre os tempos após manipulação, foi observado que em 0 h o cimento AH Plus mostrou ser o mais citotóxico em relação aos outros tempos (12 e 24h), apresentando aumento da viabilidade celular chegando à uma porcentagem de 50% de viabilidade a partir da diluição 1:16. Acreditamos que essa intensa citotoxicidade nas menores diluições (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8) e neste tempo inicial de 0 h foi resultante da liberação de éter diglicidílico de bisfenol A, que tem sido identificado como um componente mutagênico de materiais à base de resina, e que também podem ser citotóxicos (Heil et al., 1996). Esta liberação pode ocorrer antes do endurecimento do material, concordando com Cohen et al. (2000) e Leonardo et al. (1999) que demonstraram níveis de liberação de uma substância conhecida tóxica, o formaldeído (FA), após a manipulação do cimento AH Plus provenientes de aminas adicionadas para acelerar a polimerização, fato esse não revelado pelo fabricante, outros autores também concordam com essa afirmação (Eldeniz et al., 2007, Merdad et al., 2007, Lodiene et al., 2008). Entretanto, segundo Schweikl e Schmalz (2000) a citotoxicidade do AH Plus está ligada à presença da resina epóxica na pasta A da sua apresentação.

O resultado obtido neste estudo está de acordo com a pesquisa de Eldeniz et al. (2007), onde as amostras logo após a manipulação de AH Plus inibiram significativamente o crescimento de células L929, sendo um material bastante citotóxico. Ainda outros estudos demonstram a citotoxicidade do AH Plus apesar da análise em diferentes culturas celulares e utilizando diferentes metodologias (Cohen et al. 2000,

Miletic et al. 2000, Willershausen et al. 2000, Tai et al. 2001, Huang et al. 2004, Miletic et al. 2005).

Em contraste aos resultados mostrados, Senne *et al.* (2009) demonstraram em seu estudo que AH Plus provou ser menos tóxico, logo após a manipulação, e mostrou leve reação tóxica quando foi testado após o endurecimento, por meio de um estudo *in vitro* comparando-o ao Endofill e Sealer 26 sobre uma linhagem de células VERO (C1008 – CRL – 1586, ATCC, Rockville, MD, USA).

No presente estudo verificou-se que em 12 horas, houve um aumento expressivo na viabilidade celular demonstrado já na diluição 1:2, mantendo nas seguintes diluições valores muito próximos ao grupo controle, evidenciando a baixa citotoxicidade neste período, o que leva a pensar em um provável resultado da diminuição na degradação de substâncias tóxicas, diminuindo assim a citotoxicidade do AH Plus com o tempo, resultado semelhante a outros estudos (Miletic et al. 2000, Azar et al. 2000, Huang et al. 2004).

Contudo, os resultados obtidos no presente estudo, no tempo de 24 horas, semelhante ao tempo 0 h, inicialmente o AH Plus se mostrou citotóxico, sendo que as amostras até a diluição 1:4 apresentam baixa viabilidade celular, ocorrendo uma retomada da taxa aceitável de viabilidade (50%) a partir da diluição 1:8. Estando em concordância com os achados de Miletic et al. (2005), que mostrou uma queda na viabilidade celular em 24 horas quando comparado a 1h, 48h, 7 dias e 1 mês na citotoxicidade do AH Plus, em células L929.

Ainda a citotoxicidade das pastas A e B, separadas ou misturadas, do cimento AH Plus foram testadas por Schweikl & Schmalz (2000) imediatamente após a manipulação e após 24 h. A mistura das pastas, após a manipulação foi citotóxica, fato não observado após 24 h do endurecimento do cimento. Os resultados obtidos por estes autores em 24 h não correspondem aos resultados obtidos no presente estudo.

Essa característica nos leva acreditar que ainda com o

decorrer do tempo há uma liberação tardia de substâncias citotóxicas, mesmo após o período de endurecimento do material obturador. Concordando com esta afirmação, o estudo realizado por Oztan et al. (2003), comparou a citotoxicidade, após o contato dos extratos de AH Plus e RoekoSeal em células L929 por um período de 24, 48 e 72 h. Observaram que após o tempo inicial houve pequenas reduções na viabilidade celular, afirmando ainda que é possível que os constituintes potencialmente tóxicos possam ser liberados a partir dos materiais por dissolução em fluidos do tecido. Existem diferentes quantidades de substâncias reativas do cimento logo após a manipulação e após o endurecimento, sendo assim diferenças podem ser vistas entre a toxicidade dos cimentos nestes dois períodos.

No presente estudo, a exposição das células ao extrato do cimento EndoRez no tempo 0 h, 12 h e 24 h, reduziu a viabilidade dos fibroblastos a taxas perto de 0% de viabilidade nas diluições 1:1, 1:2, ocorrendo um pequeno aumento nas diluições seguintes, demonstrando viabilidade somente nas duas últimas diluições 1:8 em 24 h, 1:16 e 1:32 em todos os tempos. Na diluição 1:32, o tempo 0 h foi aquele que mostrou maior viabilidade celular em comparação com o tempo 12 h e 24 h. O tempo 12 h foi o que demonstrou maior citotoxicidade entre os três tempos.

Em relação aos cimentos estudados, o EndoRez foi o que apresentou maiores taxas de citotoxicidade.

Os presentes resultados estão de acordo com outros estudos, que também informaram que o EndoRez é altamente citotóxico (Bouillaguet et al. 2004, Eldeniz et al. 2007). Além disso, a toxicidade *in vivo* do EndoREZ foi verificada em um estudo de reação ao subcutâneo de ratos, onde este provocou reações do tecido de leves a severas, que diminuíram após 30 dias (Zmener 2004). Scarparo et al. (2009) em estudo da análise da resposta inflamatória frente aos cimentos AH Plus, EndoRez e EndoFill inseridos em subcutâneo de ratos, verificaram uma tendência da resina de metacrilato e do óxido de zinco-eugenol ter

aparentemente maior potencial de irritação tecidual. O EndoREZ aparentemente causou uma reação mais intensa do que as observadas tanto no grupo AH Plus ou no grupo controle, especialmente durante períodos mais longos.

Acredita-se que o Dimetacrilato de uretano (UDMA) na composição deste cimento pode ser responsável pelo seu efeito citotóxico. Tem sido mostrado previamente que UDMA é um agente tóxico (Hikage et al. 1999) que pode causar danos celulares devido ao esgotamento do nível intracelular do antioxidante glutathione, mesmo em baixas concentrações em um curto período de tempo (Volk et al. 2006). De fato, a diminuição da glutathione é uma reação precoce, que é acionado antes de outras alterações citotóxicas (Volk et al. 2006).

Durante o experimento em laboratório do presente estudo, foi observada uma alteração da coloração dos meios de cultura que se encontravam em contato com o cimento EndoREZ para a confecção dos extratos originais, a coloração do extrato referente a 0 h apresentou uma cor alterada, porém ainda perto da cor do meio de cultura original, já as diluições de 12 e 24 h apresentaram uma coloração mais alaranjada, no entanto para essa ocorrência caberia novos estudos para melhor explicação sobre este fenômeno.

EndoRez é um cimento resinoso hidrofílico, dual, ou seja, ocorrem dois tipos de polimerização, uma dependente de fonte de luz por meio de fotoativação e autopolimerização por reação química. Esse tipo de resina possui um tratamento superficial para impedir o contato com o oxigênio da atmosfera e favorecer a maior conversão dos monômeros presentes, a reação de polimerização das resinas autopolimerizáveis pode ser fortemente inibida pelo oxigênio. A reatividade do oxigênio com os radicais livres é maior do que dos radicais livres com os monômeros. A inibição resultante da difusão do oxigênio da atmosfera para o interior das resinas é responsável pela camada inibitória frequentemente encontrada nas resinas recém-polimerizadas (Vallittu. 1999).

Segundo Franco et al. (2002), o oxigênio inibe a vinil polimerização nas resinas. Os compósitos não completam a polimerização e aproximadamente 40 a 60% das ligações de carbono permanecem insaturadas. Esse raciocínio foi descrito por Rueggeberg e Margeson (1990), que afirmaram que o oxigênio pode produzir uma fina película de polímero com um baixo grau de polimerização. Este fato provavelmente causou a inibição ou retardo da completa polimerização do cimento, uma vez que em meio as condições deste estudo, por mais que se tenha tentado a diminuição do contato do ar com o cimento por intermédio do recobrimento das placas de 24 poços com o parafilm, ainda assim, havia uma coluna de ar aprisionada entre cimento e o parafilm, podendo então o oxigênio difundir para o interior da resina e potencializar a camada inibitória durante o tempo. Assim, no presente estudo, pode se observar uma diminuição na viabilidade celular na diluição 1:16 e 1:32 do tempo 12 h em relação ao tempo 0 h e a diluição 1:32 no tempo 24 h, levando em consideração a hipótese anterior.

Bouillaguet et al. (2004) avaliaram a citotoxicidade pelo ensaio de MTT e impermeabilização dos cimentos RoekoSeal, EndoRez e TopSeal, após a manipulação, 24 h, 48 h e 1 semana em fibroblastos de ratos Balb/c 3T3. Estes autores obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, onde observaram que com o passar do tempo pode haver uma diminuição nos valores de viabilidade celular. Após uma semana do cimento em contato com as células houve uma nova diminuição da viabilidade celular em relação ao tempo de endurecimento de 24 h. Quanto aos resultados da propriedade de impermeabilização, concluíram que o RoekoSeal foi o material que proporcionou maior impermeabilização, sendo este um cimento promissor por apresentar baixa citotoxicidade e boa impermeabilização.

Ainda, os resultados de Bouillaguet et al. (2004) também estão em concordância com este estudo, ao observar que o RoekoSeal apresentou menor citotoxicidade do que o EndoRez.

Em contrapartida, Karapinar al. (2011) discorda dos resultados encontrados neste presente estudo, onde foi investigada a citotoxicidade dos cimentos AH Plus, EndoRez, RoekoSeal, Epiphany e Activ GP em células de fibroblastos de ratos L929 e cultura primária de células da polpa humana. Após os períodos de endurecimento indicados pelos fabricantes (24 e 72 h), os extratos dos cimentos obtidos de 1, 4 e 7 dias em diluições de 50 e 25% dos extratos originais foram testados pelo MTS. Os resultados mostraram que não houve significativa citotoxicidade nos grupos EndoRez, AH Plus e RoekoSeal. Provavelmente estes resultados foram diferentes da maioria dos trabalhos devido a baixa relação área/volume ($25,13 \text{ mm}^2/\text{mL}$), sendo que o recomendado pelas normas da ISO (1992) que propõe a padronização dos espécimes na relação área/volume é de 50 a $600 \text{ mm}^2/\text{mL}$. Outros estudos também mostraram pouca ou nenhuma citotoxicidade deste material (Miletic et al. 2005; Lodiene et al. 2008).

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com outros estudos que também observaram citotoxicidade do EndoREZ (Al-Hiyasat et al., 2010; Eldeniz et al., 2007; Silva et al., 2008; Ames et al., 2009; Gencoglu et al., 2010).

Conforme descrito anteriormente, neste estudo, a manipulação do EndoREZ e condicionamento do material foram realizados cuidadosamente seguindo as recomendações do fabricante, especialmente após a manipulação, quando o material foi fotopolimerizado, vedado com parafilm e colocado em estufa de CO_2 para diminuir a influência do oxigênio, fator este que segundo o fabricante impede o endurecimento do material. Contudo o material foi o mais citotóxico dentre os testados. Provavelmente outros fatores além do não endurecimento devem influenciar em sua citotoxicidade, como o desequilíbrio no mecanismo redox e até mesmo a ação de alguns ativadores não descritos pelo fabricante.

Deve se levar em consideração que *in vitro* a citotoxicidade do EndoRez, não necessariamente reflete um risco por um longo tempo, tendo em vista que em laboratório não se consegue reproduzir toda a magnitude dos organismos referentes às respostas frente a um estímulo, respostas de reparação, respostas imunes e circulação sanguínea que o organismo possui. A discrepância de resultados em torno da citotoxicidade destes cimentos pode ser explicada pelas variações das condições experimentais como mecanismos biológicos, tipo celular, método de contato material-célula, preparação dos extratos e tempo de exposição (Oztan et al., 2003).

O cimento experimental à base do óleo resina de Copaíba no tempo 0 h obteve os melhores resultados de viabilidade celular dentre os tempos estudados, mesmo reduzindo a sobrevivência celular em 17,52% na diluição 1:1, mas já na diluição 1:2 obteve bons resultados de viabilidade celular próximo a 70,63%, apresentando semelhante ao grupo controle a partir da diluição 1:8. No tempo 12 h ocorreu uma redução de sobrevivência celular a 0,69% nos extratos originais (1:1) e 60,41% na diluição 1:2. No tempo 24 h, o cimento da Copaíba foi severamente citotóxico nas concentrações originais reduzindo a sobrevivência celular a 1,13%. Porém, a partir da diluição 1:2 melhorou a sobrevivência celular em 64,69%, chegando a resultados semelhantes ao controle na diluição 1:8 (99,79%).

O cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba, apresenta resultados promissores quanto sua utilização clínica, também devido a suas satisfatórias propriedades físico-químicas nos testes requeridos pela ADA (Garrido et al., 2010) e também por sua atividade antibacteriana (Vasconcelos et al., 2008).

Durante a pesquisa no laboratório, este cimento não apresentou nenhum tipo de modificação quanto à coloração do meio em contato para a confecção dos extratos originais, nem tão pouco houve achados de fragmentos do cimento no extrato após sua remoção, garantia

de uma provável estabilidade das propriedades físicas, a qual pôde ser observada por Rosa et al. (2010) ao estudar a alteração dimensional e solubilidade deste cimento em água destilada e em fluído tissular simulado.

Os estudos em torno dos cimentos da linha fitoterápica demonstram resultados promissores quanto à viabilidade celular.

Também na linha de pesquisas com cimentos experimentais à base de fitoterápicos, Camargo et al. (2009a), estudaram a citotoxicidade de um outro cimento endodôntico experimental à base do polímero da mamona (Polifil) e observaram um excelente padrão de sobrevivência celular em todas as diluições sobre fibroblastos de polpa humana imortalizados (tHPC). A propósito, nas condições em que o estudo foi realizado, os extratos originais do Polifil produziram apenas uma mínima redução no número de células sobreviventes nos ensaios de cristal violeta (87,9%) e não foram genotóxicos analisados pela formação de micronúcleos.

Diante de bons resultados encontrados no presente estudo e na pesquisa realizada por Camargo et al. (2009a), os pesquisadores precisam investir ainda mais nesta nova linha de cimentos endodônticos fitoterápicos, para que haja um aprimoramento maior das propriedades físicas destes cimentos para facilitar e viabilizar o seu uso clínico.

Ao selecionar um material para o tratamento endodôntico, a biocompatibilidade é uma das propriedades desejáveis. Testes *in vitro* de citotoxicidade oferecem algumas informações ao clínico sobre as propriedades dos novos cimentos endodônticos em comparação com os utilizados atualmente (Al-Hiyasat et al., 2010). Os resultados do presente estudo mostram que os cimentos à base de resinas apresentaram diferentes níveis de citotoxicidade, no entanto, o objetivo na obtenção dos extratos originais foi a extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução num líquido, portanto, a

citotoxicidade pode diminuir ao longo do tempo. Como o estudo foi realizado durante um período de tempo relativamente curto (24 h), estudos de longo prazo são necessários para avaliar se estes materiais permanecem citotóxicos ao longo do tempo ou se perdem este potencial.

Devido a severa citotoxicidade do EndoRez e do AH Plus, moderada citotoxicidade dos extratos originais do cimento experimental à base de óleo-resina da Copaíba e discreta citotoxicidade do RoekoSeal foi realizado o ensaio de cometa para verificar os possíveis danos ao DNA celular que estes cimentos poderiam induzir.

Desta forma, verificou-se que as diluições escolhidas para a análise de genotoxicidade do EndoRez 1:16 (0 h), 1:8 (12 h), 1:8 (24 h) foram capazes de induzir alterações no DNA celular, demonstrada pela formação de cometas. De acordo com o ensaio de cometa, o tempo que mostrou maior genotoxicidade foi o de 24 h superando excessivamente os valores do controle positivo EMS, seguido de uma menor genotoxicidade do tempo 12 h e 0 h, sendo que este último período, mostrou valores perto do controle negativo. Tais resultados indicam, a possibilidade já observada na citotoxicidade deste estudo, que algum ou alguns componentes deste cimento pode provocar uma reação tardia.

Em estudo prévio, Camargo et al. (2009a), utilizando tempo após manipulação de 6 h, verificaram por um outro teste de genotoxicidade, o ensaio de micronúcleo, que o cimento à base de resina derivado de multimetacrilatos Epiphany/RealSeal (BisGMA, UDMA, monômeros hidrofílicos, resina EBPADMA, aminas, estabilizador), não foi genotóxico quanto a formação de micronúcleos (19 micronúcleos formados para cada 1000 células na diluição 1:8, e o controle negativo 11,5 micronúcleos para cada 1000 células). Considerando que o cimento Epiphany possui o metacrilato UDMA em sua composição, não se pode associar a alta genotoxicidade do EndoREZ exclusivamente à presença do UDMA, contudo sua concentração provavelmente é bem maior neste cimento que apresenta apenas este metacrilato em sua composição.

Entretanto, mais estudos devem ser realizados para se entender o real componente responsável por esta alta genotoxicidade do cimento EndoREZ.

Schweikl et al. em 2006, realizando uma revisão da literatura sobre a toxicidade celular e genética de monômeros resinosos presentes em materiais dentários, ressaltaram que o método de indução de genotoxicidade de monômeros resinosos parece estar ligado a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que retardam o ciclo celular induzindo excessiva apoptose celular pela quebra do balanço redox mitocondrial pela inativação dos antioxidantes como a glutathione, ácido ascórbico, entre outros. Desta maneira, estes monômeros possuem uma alta capacidade citotóxica e genotóxica.

Para o cimento AH Plus as diluições selecionadas foram 1:16 (0 h) 1:8 (12 h) e 1:16 (24 h), as quais mostraram valores genotóxicos condizentes aos valores citotóxicos encontrados neste estudo, ocorrendo maior genotoxicidade no tempo 0 h e 24 h, sem diferença significativa. O tempo 12 h apresentou pequena genotoxicidade, abaixo do controle negativo, e para este tempo foi observado a maior viabilidade celular entre os tempos no teste de citotoxicidade.

Os resultados do presente estudo não concordam com Lodiene et al. (2008), os quais observaram severa citotoxicidade e baixa genotoxicidade do cimento AH Plus imediatamente após a manipulação. Este fato corrobora com Camargo et al. (2009a) que analisou este cimento em tempo de endurecimento de 6 h, encontrando resultados muito semelhantes de baixa genotoxicidade. Já Leyhausen et al. (1999), verificaram que o AH Plus não apresentou genotoxicidade após tempo de endurecimento de 24 h quando submetido a quatro testes genotóxicos.

Schweikl e Schmalz, (2000), observaram que a resina epóxica da pasta A é o componente mutagênico do AH Plus recém espatulado, uma vez que quando avaliadas separadamente, a pasta B não foi mutagênica, mas a pasta A induziu a formação de micronúcleos.

Huang et al. (2002) também verificaram genotoxicidade do AH Plus em extratos realizados com DMSO quando submetidos ao ensaio do cometa.

Nas condições experimentais em que o estudo foi realizado, pôde-se verificar que o RoekoSeal não apresentou efeitos citotóxicos, porém apresentou consideráveis efeitos genotóxicos, foi o segundo cimento a apresentar maior genotoxicidade no tempo 24 h, maior do que o controle positivo, depois do EndoRez. Nos demais tempos, em 0 h demonstrou menor genotoxicidade, próximo ao controle negativo e 12 h mostrou moderada genotoxicidade, para todos os tempos foi selecionada a diluição 1:2. De acordo com este contraponto entre os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, são necessários mais estudos com o cimento RoekoSeal para que possam justificar tal acontecimento.

No presente estudo, a grande surpresa ocorreu nos resultados satisfatórios do cimento experimental à base de óleo resina de Copaíba, embora apresentando inicialmente no tempo 0 h (diluição 1:2) alto grau de dano ao material genético próximo ao controle positivo, nos tempos seguintes 12 h e 24 h, todos na mesma diluição 1:2, apresentaram queda das taxas de genotoxicidade, sendo que em 12 h não houve diferença com o controle negativo e em 24 h não ocorreu dano ao DNA celular. Cavalcanti et al. (2006) estudaram o ácido Kaurenóico, um diterpenoide bioativo presente no óleo da Copaíba, e verificaram que altas concentrações deste ácido induziu danos ao DNA de células V79. Porém, estes danos diminuíram com o aumento das diluições.

Assim, levando-se em consideração os testes de citotoxicidade e genotoxicidade realizados neste presente estudo podemos delinear os seguintes acontecimentos. Os extratos do AH Plus mostraram citotoxicidade elevada nas diluições mais concentradas e nos tempos de 0 h e 24 h com relação ao tempo 12 h, que a partir da diluição 1:4 não foi citotóxico. Condizente com o resultado da citotoxicidade, também apresentou um baixo dano ao DNA celular apenas no tempo 12 h. O EndoREZ foi o cimento que apresentou maior efeito citotóxico e

genotóxico. Estes resultados podem ser atribuídos ao componente UDMA e a outros ativadores desconhecidos presentes na sua composição.

Já o cimento experimental à base de óleo resina da Copaíba mostrou citotoxicidade nos extratos originais (1:1) nos três tempos avaliados, mas não mostrou citotoxicidade a partir da diluição 1:2, seus efeitos genotóxicos em função do tempo diminuíram acentuadamente, ao ponto que em 24 h não houve nenhum dano genético. Porém, o cimento RoekoSeal apresentou os melhores valores quanto à citotoxicidade, não sendo citotóxico às células, entretanto, foi o segundo cimento mais genotóxico do estudo.

Entende-se que este estudo foi muito importante na confirmação de resultados anteriores quanto ao AH Plus, EndoRez, RoekoSeal, e também para o entendimento do comportamento do cimento derivado do óleo da Copaíba, verificando que muitas vezes uma única análise quanto a biocompatibilidade do cimento não é suficiente, sendo necessário um conjunto de testes para ampliar o esclarecimento sobre as propriedades do material para avaliar se o mesmo apresenta as características ideais. Pois, de acordo com os resultados levantados neste estudo, materiais que apresentam citotoxicidade não necessariamente são genotóxicos.

No entanto, mais estudos devem ser realizados para que se entenda o comportamento biológico dos cimentos endodônticos, bem como continue se desenvolvendo cimentos experimentais, especialmente derivados de extratos vegetais que possam apresentar efeitos mais biológicos. Também como complementação ao comportamento biológico em curtos períodos é importante pesquisar os efeitos longitudinais dos diferentes cimentos quanto a sua biocompatibilidade e resistência a degradação no interior dos canais. Além da necessidade do entendimento das interações químicas entre soluções irrigadoras, medicações intracanal, substrato dentinário e os materiais obturadores incluindo guta-percha, cimentos e os materiais de desinfecção.

7 CONCLUSÃO

Quanto a citotoxicidade:

- Com excessão do cimento RoekoSeal, que foi semelhante ao controle, todos os cimentos foram citotóxicos;
- Tempo 0h, AH Plus e EndoREZ foram os mais citotóxicos e extrato original do cimento experimental de óleo de Copaíba;
- Tempo 12h, EndoREZ foi o mais citotóxico seguido do cimento experimental de óleo de Copaíba e AH Plus;
- Tempo 24h, EndoREZ e AH Plus foram os mais citotóxicos seguidos do cimento experimental de óleo de Copaíba.

Quanto a genotoxicidade:

- As diluições dos cimentos RoekoSeal e EndoREZ em 24h foram as que mais causaram danos ao DNA, sendo que somente o EndoREZ obteve diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*. 2007 Jan;17(1):114-40.

Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*. 2008 Jan;18(1b):472-508.

Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J*. 2010 Feb;43(2):148-53.

Almeida FR. Avaliação do pH, tempo de presa e atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, associado a pós de cimentos odontológicos [dissertação]. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde: Universidade de Brasília;1998

Ames JM, Loushine RJ, Babb BR, Bryan TE, Lockwood PE, Sui M, et al. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):225-8.

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

¹ Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2010 set; citado em 14 set.] Disponível em: http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *Journal of Endodontics*. 2000 Aug;26(8):462-5.

Bandeira MFCL, Oliveira MRB, Benatti-Neto C, Camelli Lia RC. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da Copaifera multijuga (óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. *J Bras Clin Estet Odontol*. 1999 Jul;3(16):42-9.

Bandeira MFCL. Análise comparativa sobre a compatibilidade biológica do óleo essencial e do óleo in natura da Copaifera multijuga (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio em capeamento pulpar em dentes de cães [tese]. Araraquara: Faculdade de Odontologia (SP): UNESP Univ Estadual Paulista, 2000.

Bandeira MFCL, Teixeira MFS, Abinader CD, Parente RC, Lima PSL. Avaliação in vitro da sensibilidade da Candida albicans ao hidróxido de cálcio associado ao óleo da copaíba. *Rev Dentística on line*. 2006;13:12-22.

Bergmans L, Moisiadis P, De Munck J, Van Meerbeek B, Lambrechts P. Effect of polymerization shrinkage on the sealing capacity of resin fillers for endodontic use. *J Adhes Dent*. 2005 Winter;7(4):321-9.

Bertram JS. The molecular biology of cancer (review). *Mol Aspects Med*. 2001; 21:167-223.

Bevilacqua, S. Obturação dos canais radiculares. In: Filgueiras, J. et al. *Endodontia Clínica*. Rio de Janeiro:Científica; 1962. p.309-10.

Biavatti MW, Dossin D, Deschamps FC, Lima MP. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Rev Bras Farmacogn*. 2006 Apr;16(2):230-5.

Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci*. 2004 Apr;112(2):182-7.

Bloise MI. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. *Cosmetics & Toiletries*. 2003 Dec;15(1):46-49.

Bruneton J. *Eléments de phytochimie et de Pharmacognose*. Paris: Lavoisier; 1987.

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

Caicedo R, Von Fraunhofer JA. The properties of endodontic sealer cements. *J Endod*. 1988;14(11):527-34.

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

Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*. 2009b Mar;42(3):227-37.

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

Camps J, Salomon JP, Pertot WJ, Dejou J. The coherence between 3 evaluation methods of biocompatibility. *J Biol Buccale*. 1992 Dec;20(4):211-7.

Castro-Silva JPMS. Efeitos de novos compostos azotados com potencial farmacológico na proteção do estresse oxidativo [dissertação]. Portugal: Escola de Ciências, Universidade do Minho; 2004.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM, et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol*. 2006 Mar;44(3):388-92.

Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. *Int Endod J*. 2005 Aug;38(8):505-9.

Cobankara FK, Adanir N, Belli S, Pashley DH. A quantitative evaluation of apical leakage of four root-canal sealers. *Int Endod J*. 2002 Dec;35(12):979-84.

Costa CAS. Teste de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. Metodologia científica – ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 146-60.

Cohen B, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod*. 2000 Apr;26(4):228-9.

Cohen S, Hargreaves KM. Caminhos da polpa. 9 ed. São Paulo: Elsevier Brasil; 2007.

Collins A, Ai-guo M, Duthie S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mut. Res*. 1995 Jan;336(1): 69-77.

Collins A, Dusinská M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen*. 1997; 30(2):139-46.

Collins AR. The comet assay for DNA damage e repair: principles, applications, e limitations. *Mol Biotechnol*. 2004 Mar;26(3):249-61.

Duarte MA, Demarchi AC, Giaxa MH, Kuga MC, Fraga SC, de Souza LC. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *J Endod*. 2000Jul; 26(7):389-90.

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

May;40(5):329-37.

Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, Schweikl H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. *J. Endod.*1999;25(5):359-363.

Estrela C. Metodologia científica – Ciência – Ensino – Pesquisa. São Paulo: Artes médicas; 2005, 2 ed. p 213-14.

Flores DSH, Rached-Júnior FJA, Versiani MA, Guedes DFC, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J.* 2011 Feb;44(2):126-35.

Franco EB, Lopes LG, D'Alpino, PH, Pereira JC, Mondelli RF, Navarro MF. Evaluation of compatibility between different types of adhesives and dual-cured resin cement. *J Adhes Dent.* 2002;4(4):271-5.

Freshney RI. Culture of Animal Cell: a manual of basic technique. 4th ed. Indianapoís: Wiley Liss; 2000.

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

Garrido AD, Lia RC, Franca SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *Int Endod J.* 2010 Apr;43(4):283-91.

Gencoglu N, Sener G, Omurtag GZ, Tozan A, Uslu B, Arbak S, et al. Comparision of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta Histochem.* 2010 Nov;112(6):567-75.

Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. *Aust Endod J.* 2001 Apr;27(1):12-21.

Grossman LI. An improved root canal cement. *J Am Dent Assoc.* 1958 Mar; 56(3):381-5.

Hagge MS, Wong RD, Lindemuth JS. Effect of three root canal sealers on the retentive strength of endodontic post luted with a resin cement. *Int Endod J*. 2002; 35(4):372-8.

Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Extended setting shrinkage behavior of endodontic sealers. *J Endod*. 2008 Jan;34(1):90-3.

Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhausen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. *Mutat Res*. 1996 Jul 5;368(3-4):181-94.

Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J*. 1988 Mar;21(2):89-99.

Hikage S, Sato A, Suzuki S, Cox CF, Sakaguchi K. Cytotoxicity of dental resin monomers in the presence of S9 mix enzymes. *Dent Mater J*. 1999 Mar;18(1):76-86.

Hovland EJ, Dumsha TC. Leakage evaluation in vitro of the root canal sealer cement Sealapex. *Int Endod J*. 1985 Jul;18(3):179-82.

Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells in vitro. *Int Endod J*. 2002 Nov;35(11):905-9.

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

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

Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004 Jul; 15(7), 767–71

Hume WR. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. J Am Dent Assoc. 1986 Nov;113(5):789-91.

Huumonen S, Lenander-Lumikari M, Sigurdsson A, Orstavik D. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment: a comparison between a silicone-based and a zinc oxide-eugenol-based sealer. Int Endod J. 2003 Apr;36(4):296-301.

ISO documento 10993, Biological evaluation of medical devices ┐ Part 5: Tests for cytotoxicity *in vitro* methods, 1992.

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

Kim E, Jeon IS, Kim JW, Kim J, Jung HS, Lee SJ. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. Oral Dis. 2007 Sep;13(5):495-9.

Kopper PM, Figueiredo JA, Della Bona A, Vanni JR, Bier CA, Bopp S. Comparative in vivo analysis of the sealing ability of three endodontic sealers in post-prepared root canals. Int Endod J. 2003;36(12):857-63.

Leonardi DP, Battisti JC, Klimiont DT, LIMIONT** Paulo Henrique Tomazinho PH, Filho FB, Haragushiku GA, Tomazinho FSF. Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos. RSBO 2009;6(4):367-73.

Leonardo MR, Da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. Endod Dent Traumatol. 1999 Feb;15(1):28-32.

Leonardo MR. Endodontia Tratamento de Canais Radiculares. 4 ed. São Paulo. Artes Médicas 2008.

Leonardo MR, Flores DS, de Paula ESW, de Toledo Leonardo R, da

Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH plus root canal sealers: a histopathological evaluation. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):822-5.

Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod*. 1999 Feb;25(2):109-13.

Li Y. Biological properties of peroxidecontaining tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology*. 1996;34(5):887-904.

Lima LS, Torkasky RM, Psiciottano NC, Santos AM, Schumacker IE. Plantas medicinais. *Cosmetics & Toiletries*. 1995;7(1):39.

Lima SR, Veiga Junior VF, Christo HB, Pinto AC, Fernandes PD. In vivo and in vitro studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* hayne and its fractions. *Phytother Res*. 2003 Nov;17(9):1048-53.

Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J*. 2008 Jan;41(1):72-7.

Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact millipore filter assays. *J Endod*. 2007 Jan;33(1):24-7.

Miletic´ I, Anic´ I, Karlovic´ Z, Marsˇan T, Pezelj-Ribaric´ S, Osmak M. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endodontics and Dental Traumatology*. 2000 Dec;16(6): 287–90.

Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod*. 2005 Apr;31(4):307-9.

Opdyke DLJ . Balsam Copaiba. *Food Cosmetics Toxicology*. 1976;14(1):687.

Oztan MD, Yilmaz S, Kalayci A, Zaiimog L. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two root canal sealers. *J, Oral Rehab.* 2003 Apr;30(4):426-9.

Pascon EA, Sousa CJA, Langeland K. Biocompatibility of endodontic materials: cytotoxicity of a polyurethane resin derived from castor beam oil. *Braz Endod J.* 2001;5:5-12.

Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. *Int Dent J.* 1980 Jun;30(2):140-88.

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

Ribeiro DA, Duarte MAH, Matsumoto MA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod.*, 2005;31(8):605-07.

Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. In vitro biocompatibility tests of two commercial types of mineral trioxide aggregate. *Braz Oral Res.* 2005;19(3):183-18.

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

Rosa PCF, Mancini MNG, Camargo SEA, Garrido ADB, Camargo CHR, Rode SM. Dimensional Alterations and solubility of new endodontic sealers. *Braz Dent J.* 2010;21(4): 301-4.

Rueggeberg FA, Margeson DH. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res.* 1990 Oct;69(10):1652-8.

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 May;103(3):277-81.

Scarpato RK, Grecca FS, Facbin EVF. Analysis of Tissue Reactions to Methacrylate Resin-based, Epoxy Resin-based, and Zinc Oxide-(1) Eugenol Endodontic Sealers. *JOE*. 2009 Feb;35(2):229-32.

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 Dec;27(12):741-3.

Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J*. 2003; 36(10):660-9.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22 Suppl 2:S6-11.

Schmalz G, Hoffmann M, Weis K, Schweikl H. Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc oxide-eugenol in vitro. *J Endod*. 2000 May;26(5):284-7.

Schmalz G. Materials Science: Biological Aspects. *J Dent Res*. 2002; 81(10):660-3.

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

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

Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig*. 1998 Sep;2(3):125-9.

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

Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*. 2006 Oct;85(10):870-7.

Senne MI, Lemos 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):71-76.

Silva-Herzog D, Ramírez T, Mora J, Pozos AJ, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P. Preliminary study of the inflammatory response to subcutaneous implantation of three root canal sealers. *Int Endod J*. 2011;44(5):440-6.

Silva RG, Saviolli RN, Cruz-Filho AM, Pécora JD. Estudo da estabilidade dimensional, solubilidade e desintegração e radiopacidade de alguns cimentos obturadores dos canais radiculares do tipo grossman. *Ver ABO Nac*. 1994;2(1):40-43.

Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo : funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*. 2003;1:32-40.

Sizue RO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mat Res*. 2003; 6(3):317-20.

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

Susini G, About I, Tran-Hung L, Camps J. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endod J*. 2006 Dec;39(12):940-4.

Tai KW, Huang FM, Huang MS, Chang YC. Assessment of the genotoxicity of resin and zinc-oxide eugenol-based root canal sealers using an in vitro mammalian test system. *J Biomed Mater Res*.

2002;59(1):73-7.

Tagger M, Tagger E, Tijan AH, Bakland LK. Measure ment of adhesion of endodontic sealers to dentin. J Endod. 2002;28(5):351-4.

Tanomaru-Filho M, Tanomaru JMG, Leonardo MR, Silva LAB. Periapical Repair after Root Canal Filling with Different Root Canal Sealers. Braz Dent J.2009; 20(5):389-395.

Tay FR, Loushine RJ, Monticelli F, Weller RN, Breschi L, Ferrari M, et al. Effectiveness of resin-coated gutta-percha cones and a dual-cured, hydrophilic methacrylate resin-based sealer in obturating root canals. J Endod. 2005 Sep;31(9):659-64.

Testarelli L, Andreasi Bassi M, Gambarini G. [In vitro evaluation of five root canal sealers]. Minerva Stomatol. 2003 Jan-Feb;52(1-2):19-24.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen 2000;35(3):206-21.

Timpawat S, Amornchat C, Trisuwan W. Bacterial coronal leakage after obturation with three root canal sealers. J Endod. 2001; 27(1):36-9.

Valera MC, Leonardo MR, Bonetti Filho I. Cimentos endodônticos – selamento marginal apical imediato e após aemazenamento de seis meses. Ver Odontol Univ São Paulo.1998; 12(4):355-60.

Vasconcelos KRF, Veiga Jr VF, Rocha WC, Bandeira MFCL. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resin de Copaifera multijuga Hayne. Braz J Pharmacogn. 2008;18(supl.):733-8.

Vallittu PK. Unpolymerized surface layer of autopolymerizing polymethyl methacrylate resin. J Oral Rehabil. 1999;26(3):208-12.

Veiga Jr VF, Zunino L, Calixto JB, Patitucci ML, Pinto AC. Phytochemical

and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytother Res.* 2001;15(6): 476-80.

Veiga Jr VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *QuimNova.* 2002;25(2): 273-286.

Veiga Jr VF, Zunino L, Patitucci ML, Pinto AC, Calixto JB. The Inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(10): 1405-10.

Veiga Jr VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J Ethnopharmacol.* 2007 Jun;112(2):248-54.

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

Volk J, Leyhausen G, Dogan S, Geurtsen W. Additive effects of TEGDMA and hydrogenperoxide on the cellular glutathione content of human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2007;23(8):921-6

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

Williams DF. Biocompatibility: an overview. In: *Encyclopaedia of Medical and Dental Materials.* Oxford: Pergamon; 1990.p. 51-59.

Wu MK, Tigos E, Wesselink PR. An 18-month longitudinal study on a new silicon-based sealer, RSA RoekoSeal: a leakage study in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Oct;94(4):499-502.

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

Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod*. 2004 May;30(5):348-51.

Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Vidueira M, Macchi RL. Significance of moist root canal dentin with the use of methacrylate-based endodontic sealers: an in vitro coronal dye leakage study. *J Endod*. 2008 Jan;34(1):76-9.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa**CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 031/2009-PA/CEP, sobre “**Influência do tempo de endurecimento na citotoxicidade e genototoxicidade de diferentes cimentos endodônticos**” sob responsabilidades de **TATIANA ROCHA DE OLIVEIRA**, tendo como orientador o Prof. Adjunto **CARLOS HENRIQUE RIBEIRO CAMARGO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 21 de outubro de 2009

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora