

**CLÁUDIA VILLELA BIN**

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE CIMENTOS  
ENDODÔNTICOS**



2011

**CLÁUDIA VILLELA BIN**

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE CIMENTOS  
ENDODÔNTICOS**

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

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera  
Co-orientadora: Dra. Samira Esteves Afonso 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; 2008

B51c Bin, Claudia Villela.  
Citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos endodônticos / Claudia Villela  
Bin . \_\_ São José dos Campos : [s.n.], 2011  
107f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.  
Orientador: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera  
Co-orientador: Profa. Dra. Samira Esteves Afonso Camargo

1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Biocompatibilidade MTA. 4. MTA Obturador. I. Valera, Marcia Carneiro. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD15

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 à fonte.

São José dos Campos, 28 de Abril de 2011.

Assinatura :

E-mail: claudiavbin@bol.com.br

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
UNESP- Univ Estadual Paulista

Prof. Adj. Caio César Randi Ferraz  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
UNESP- Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 10 de junho de 2011.

## DEDICATÓRIA

*Ao meu querido avô Santos Bín (in memoriam), que tanto prestigiou os meus estudos e de meus irmãos. Avô sempre presente de quem sinto saudades todos os dias... Ao grande homem que deixou sua cultura como principal herança.*

## **AGRADECIMENTOS**

### **Aos meus amados pais Cláudio e Arlene**

A realização deste trabalho somente foi possível devido aos anos de sacrifícios de vocês, para que pudéssemos, sempre, ter a melhor educação.

Obrigada pelas oportunidades proporcionadas que me fizeram chegar até aqui.

Vocês sempre serão exemplos de amor, carinho, dedicação e superação.

Agradeço a Deus todos os dias por me abençoar com pais tão maravilhosos.

Obrigada pela família linda e unida que vocês formaram.

### **Aos meus amados irmãos Rafael e Mariana**

Agradeço pelo carinho, pelas risadas, pela ajuda, conselhos, companhia e pela nossa união em todos os momentos.

Obrigada por fazerem parte de minha vida e por me incentivarem sempre.

### **Ao meu amado João**

Obrigada pelo eterno incentivo na minha profissão, por sempre me dar forças e pelos ensinamentos diários.

Obrigada por toda ajuda na execução deste trabalho e pela imensa compreensão.

Agradeço por ser sempre tão prestativo e companheiro.

## **À querida professora e orientadora Marcia**

Primeiramente obrigada por me aceitar como sua aluna de mestrado, por acreditar em mim e por todo o aprendizado que adquiri nesse período.

Obrigada pela atenção extrema com que sempre me recebeu, tanto na faculdade quanto em sua casa. Agradeço também pela dedicação especial com que corrigiu meus trabalhos e aulas, fazendo alterações e dando conselhos que me fizeram sempre melhorar ao longo desse tempo.

Sabedoria, competência e humildade são características suas que sempre serão exemplos para mim.

Obrigada pela preocupação com os assuntos pessoais e por sua compreensão em momentos difíceis.

Agradeço pelo privilégio de presenciar seu concurso para professora Titular, além de ter conhecido uma trajetória digna de muito orgulho.

Obrigada sempre...

## **A professora e co-orientadora Samira**

Agradeço pela aceitação e confiança em meu trabalho.

Obrigada pela paciência com que sempre me ensinou a metodologia, por sempre estar presente, pelos conselhos e pela ajuda infinita que obtive.

Obrigada pela parceria...

Aos docentes da Endodontia: Ana Paula, Cláudio, Carlos Henrique, Marcia Maciel, Alberto e Simone pelos ensinamentos que me foram concedidos.

As queridas amigas da pós – graduação pela amizade construída durante o curso de mestrado. Pelas risadas de todos os dias, pelo companheirismo de cada uma de vocês.

À querida amiga Raffaella pela grande amizade que firmamos neste período, pela ajuda em todos os momentos e principalmente, pelo bom-humor contagiante...

As amigas Nádia, Adriana, Ana Cláudia, Mariana, Gleyce, Sylvia e Tatiana pela ajuda e pelo companheirismo de todos os dias... Obrigada queridas amigas!!!

Ao professor Ivan Balducci pela realização da estatística deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários da FOSJC que direta ou indiretamente muito contribuíram em meu trabalho e para o convívio diário.

A Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos – UNESP pelo incentivo durante o desenvolvimento do curso.

## SUMÁRIO

<b>LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Ensaios de citotoxicidade.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Ensaios de genotoxicidade.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Propriedades do cimento AH Plus .....</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Composição, tempo de presa, solubilidade, e pH do MTA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5 Mecanismo de ação do MTA.....</b>	<b>40</b>
<b>2.6 Biocompatibilidade do MTA.....</b>	<b>43</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Cultivo das células .....</b>	<b>49</b>
4.1.1 Descongelamento .....	50
4.1.2 Troca de meio .....	52
4.1.3 Subcultura .....	52
4.1.4 Contagem de células.....	54
<b>4.2 Plaqueamento .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3 Levantamento da curva padrão de viabilidade e crescimento celular</b>	<b>55</b>
<b>4.4 Preparo dos extratos originais .....</b>	<b>56</b>

4.4.1	Divisão dos grupos experimentais.....	56
<b>4.5</b>	<b>Condicionamento do meio de cultivo .....</b>	<b>58</b>
4.5.1	Diluições.....	59
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da viabilidade e crescimento celular .....</b>	<b>60</b>
<b>4.7</b>	<b>Ensaio de Micronúcleos (MNT).....</b>	<b>63</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Teste de MTT.....</b>	<b>66</b>
5.1.1	Estatística descritiva.....	66
5.1.2	Estatística Inferencial .....	70
<b>5.2</b>	<b>Teste de micronúcleos (MNT).....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>6.1</b>	<b>Discussão da metodologia .....</b>	<b>78</b>
<b>6.2</b>	<b>Discussão dos resultados .....</b>	<b>82</b>
6.2.1	Ensaio de citotoxicidade.....	82
6.2.2	Ensaio de genotoxicidade .....	89
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>
	<b>ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa.....</b>	<b>107</b>

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA = American Dental Association

BCRJ = Banco de células do Rio de Janeiro

BHI = Infusão de cérebro e coração (brain heart infusion)

Ca (OH)<sub>2</sub> = Hidróxido de cálcio

CaO = Óxido de cálcio

CaSO<sub>4</sub> = Sulfato de cálcio

CO<sub>2</sub> = Dióxido de carbono

CP = Cimento Portland

COX -2 = Cicloxigenase- 2

CHX = Clorexidina

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DMEM = Meio mínimo essencial modificado de Dulbecco

DMSO = Dimetil sulfóxido

EDTA = Ácido etileno diamino tetracético

EMS = Etilmetano sulfonato

ELISA = Teste imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

FACS = Citometria de fluxo (*Fluorescence-activated cell sorting*)

FAL = Fosfatase alcalina

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = Óxido de ferro

FeO = Óxido ferroso

HCl = Ácido clorídrico

HDP = Células humanas da polpa dental

HPCs = Células primárias da polpa humana

IRM = Material restaurador intermediário

LDH = Enzima citosólica lactato desidrogenase

L929 = Fibroblastos de camundongo

MDPC-23 = Células de linhagem odontoblástica de camundongo  
MEM = Meio mínimo essencial  
MEV = Microscopia eletrônica de varredura  
MNT = Teste de micronúcleo  
MPDL = Fibroblastos do ligamento periodontal de camundongo  
MTA = Agregado trióxido mineral  
MTT = Brometo (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio  
NADH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NaOCl = Hipoclorito de sódio  
NEC = Novo cimento endodôntico  
POM = Polímero derivado do óleo da mamona  
PPO = Procedimentos padrões operacionais  
PBS = Solução salina tamponada com fosfato  
PBS - CMF = Solução salina tamponada com fosfato livre de cálcio e magnésio  
QAF = Proteína quinase de adesão  
ROS = Espécies reativos de oxigênio  
RNA = Ácido ribonucléico  
SC = Silicato de cálcio  
SFB = Soro fetal bovino  
tHPC = Células pulpares humanas transformadas  
V79 = Células pulmonares de hamster Chinês

Bin CV. Citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos obturadores de canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2011.

## RESUMO

O MTA é um cimento amplamente utilizado na endodontia devido ao potencial indutor da mineralização, sendo empregado em procedimentos de proteção do complexo dentino/pulpar, retrobturação, perfurações radiculares e de furca e em dentes com rizogênese incompleta. Inicialmente esse material não foi preconizado como cimento obturador de canais radiculares. Entretanto, recentemente foi criado um cimento endodôntico resinoso contendo MTA (MTA Fillapex) com essa indicação, porém não há estudos sobre este novo material. Como o MTA é utilizado sobre os tecidos periodontal, ósseo e pulpar, é importante conhecer seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, uma vez que, alguns cimentos endodônticos podem liberar componentes tóxicos, prejudicando o processo de regeneração e reparação dos tecidos no qual entram em contato. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do MTA obturador (Fillapex) comparando-o com o MTA reparador e com o AH Plus. Fibroblastos de hamster Chinês (V79) foram colocados em contato com diferentes diluições de meios de cultura previamente expostos a esses materiais. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de MTT, em espectrofotômetro, para a verificação da taxa de viabilidade celular. A genotoxicidade foi avaliada pela formação de micronúcleos (MNT), para detecção de mutações cromossômicas. A taxa de sobrevivência celular e o número de micronúcleos antes e após a exposição aos cimentos foram estatisticamente analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados mostraram que o MTA reparador manteve a viabilidade celular acima de 50% em todas as diluições. Porém, tanto o MTA Fillapex quanto o AH Plus foram altamente citotóxicos e capazes de aumentar a formação de micronúcleos em 8 vezes em relação ao grupo controle na diluição 1:4, mostrando que são cimentos cito e genotóxicos.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Genotoxicidade. Biocompatibilidade. MTA. MTA obturador.

*Bin CV. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.*

## **ABSTRACT**

*The MTA is a sealer widely used in endodontics and for be considered a material that inducing mineralization, can be used in procedures for protection of dentin/pulp complex, retrofilling root and furcal perforations and in teeth with incomplete root formation. Initially this material was not recommended as root canal sealer. However, recently a resin sealer based on MTA (MTA Fillapex) was created for this indication, but there are no studies on this new material. As the MTA is used on the periodontal tissues, bone and pulp, it is important to know the cytotoxic and genotoxic effects, as some sealers can release toxic components, impairing the process of regeneration and repair of tissues in which they come into contact. Thus, the purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of MTA obturator (Fillapex) comparing it with the MTA repairer and AH Plus. Chinese hamster fibroblasts (V79) were placed in contact with different dilutions of culture media previously exposed to such materials. Cytotoxicity was evaluated by MTT assay in spectrophotometer to check the viability rate and cell survival. The genotoxicity was evaluated by micronucleus (MNT) to detect chromosomal mutations. The cell survival rate and number of micronuclei before and after exposure to the cement were statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn test ( $p < 0.05$ ). The results showed that MTA reparative remained cell viability above 50% in all dilutions. However, both the MTA Fillapex and AH Plus were highly cytotoxic.*

**Keywords:** Cytotoxicity. Genotoxicity. Biocompatibility. MTA. MTA obturator.

## 1 INTRODUÇÃO

A Endodontia tem como objetivo a prevenção, diagnóstico e tratamento das alterações patológicas da polpa e de suas repercussões no periápice. Desse modo, a terapia endodôntica visa à eliminação de restos pulpares, produtos da decomposição tecidual, microrganismos e de outros agentes agressores presentes no interior do sistema de canais radiculares, seguida da obturação mais hermética possível (Torabinejad, Pitt Ford, 1996; Rahbaran et al., 2008). A obturação deve ser realizada empregando materiais obturadores que não interfiram e, de preferência, estimulem o processo de reparo apical e periapical (Leonardo et al., 1999).

Um material obturador ideal deve apresentar adequadas propriedades físico-químicas e biológicas. Deve ser insolúvel nos fluidos tissulares, ter estabilidade dimensional, não sofrer corrosão, ser de fácil manipulação, ter radiopacidade, não ser carcinogênico, não ser genotóxico e ser biocompatível (Torabinejad, Pitt Ford 1996; Ribeiro et al., 2008). Dentre as propriedades biológicas dos cimentos endodônticos, a sua biocompatibilidade e potencial para indução de tecido mineralizado apical e periapical merecem destaque (Duarte et al., 2004).

O AH Plus é um cimento obturador à base de resina epóxica amplamente utilizado na endodontia. Possui adequadas propriedades físico-químicas, dentre elas, bom selamento, radiopacidade, bom tempo de trabalho, resistência, estabilidade dimensional, alto escoamento e fluidez, baixa solubilidade (Al-Khatat et al., 1995), além de possuir boa adesividade às paredes do canal radicular (Wu et al., 1997). Possui biocompatibilidade satisfatória, induzindo ligeira reação inflamatória tecidual inicial. Esta característica pode estar relacionada com

a liberação de formaldeído durante a reação de presa e pelo componente Bisfenol-A diglicidil éter, presente em sua composição, comprovadamente citotóxico. (Schweikl et al., 1998; Leonardo et al., 1999; Huang et al., 2000; Neto et al., 2006).

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) foi introduzido na endodontia em 1993 por Torabinejad e têm sido indicado para procedimentos de retrobturação, perfurações radiculares e de furca, em pulpotomias, nos casos de proteção pulpar direta e em dentes com rizogênese incompleta, agindo como barreira apical (Camilleri, Pitt Ford, 2006; Roberts et al., 2008).

A composição básica do MTA é a do cimento Portland (CP) cujos componentes principais são: silicato de tricálcio, silicato de cálcio, aluminato de tricálcio, ferro aluminato de tetracálcio, óxido de tricálcio, óxido de silicato, óxido de cálcio, sulfato de cálcio, óxido de bismuto (responsável pela sua radiopacidade) e por partículas hidrófilas (Islam et al., 2006). Quando o pó de MTA é hidratado, há a formação de um gel coloidal que se solidifica em menos de 4 horas após sua manipulação, criando uma barreira praticamente impermeável. Isto se deve, principalmente, à natureza hidrofílica de suas partículas, que permite seu uso mesmo na presença de umidade (Bortoluzzi et al., 2006; Islam et al., 2006; Camilleri, 2007).

O óxido de cálcio (CaO), um de seus principais constituintes, em presença de umidade, promove a formação do hidróxido de cálcio, responsável pelo pH altamente alcalino do material (Holland et al., 1999; Camilleri, 2007; Torabinejad, Masoud, 2010), e que pode explicar a ação antimicrobiana do MTA (Al-Nazhan et al., 2003; Al-Hezaimi et al., 2006; Asgary, Kamrani, 2008). Uma vez que, o pH básico possui efeito destrutivo sobre estruturas protéicas de alguns microrganismos, inativa certas enzimas da membrana celular com conseqüente perda da atividade biológica da mesma por destruição de

fosfolipídios e de ácidos não-saturados, levando assim à ocorrência de danos na integridade dessa membrana (Hauman, Love, 2003).

O pH alcalino (10,2 a 12,5) (Bortoluzzi et al., 2006; Torabinejad, Masoud, 2010) também pode ser o responsável pela formação de tecido mineralizado quando o material é colocado em contato com os tecidos (Enkel et al., 2008), uma vez que o pH elevado ativa e estimula a expressão da enzima fosfatase alcalina, favorecendo a formação e deposição de tecido mineralizado no local da polpa exposta e, posteriormente, permite a formação de uma cápsula fibrosa, propiciando menor reação inflamatória (Pitt Ford et al., 1995; Hauman, Love, 2003).

Desse modo, o mecanismo de ação do MTA é semelhante ao dos cimentos à base de hidróxido de cálcio (Holland et al., 2001), pois, além do pH alcalino, os íons cálcio que são liberados na reação química desses cimentos favorecem a mineralização, pois reagem com o gás carbônico tecidual formando carbonato de cálcio, o qual segundo Seux et al. (1991), participa como matriz para o processo de calcificação.

São ainda propriedades inerentes do MTA, biocompatibilidade, radiopacidade, baixa solubilidade, boa vedação, capacidade de induzir e promover a regeneração da polpa dentária e dos tecidos perirradiculares (Ribeiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2008; Torabinejad, Masoud, 2010). Perez et al., (2003) observaram que o MTA promoveu a regeneração do tecido do ligamento periodontal, estimulou a formação de um tecido semelhante ao cimento e propiciou o crescimento ósseo. Zhu et al. (2000) demonstraram ainda que osteoblastos tiveram uma resposta favorável ao MTA, uma vez que o material propiciou o crescimento dessas células e a formação de uma matriz mineralizada.

Em 1999, Holland et al., já sugeriram a utilização deste cimento como material obturador. Entretanto todas as propriedades e trabalhos descritos referem-se ao cimento MTA selador que não apresenta características físicas para ser utilizado como cimento

obturador de canais radiculares. No entanto, recentemente foi introduzido um novo cimento à base de MTA no mercado, especialmente, para ser utilizado como cimento obturador de canais radiculares. Assim, é importante conhecer os efeitos citotóxicos e as propriedades biológicas (Camilleri, 2007), deste novo cimento, comparado ao MTA selador e a um cimento obturador de canal radicular.

Para a determinação da biocompatibilidade dos cimentos endodônticos, um grande número de métodos tem sido proposto. A análise de reações celulares *in vitro* é considerada como primeira abordagem (Schmalz, 1994), uma vez que permite a caracterização da base biológica dos materiais e a análise posterior dos mecanismos celulares envolvidos. Ações celulares de interesse são toxicidade (citotoxicidade) e a influência de concentrações subletais na hereditariedade do DNA (genotoxicidade) (Schweikl et al., 2004).

Na avaliação da biocompatibilidade de um cimento obturador, testes de citotoxicidade *in vitro* são considerados testes facilmente reproduzíveis, relevantes e adequados para a avaliação de aspectos biológicos relacionados à biocompatibilidade (Chang et al., 1998). Neste tipo de análise, o ensaio pelo brometo (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), demonstrou-se rápido e preciso. Este reflete não somente o número de células de uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, porque é baseado na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase, presente em células viáveis (Bouillaguet et al., 2004).

Apesar de existirem muitos estudos na literatura referentes à citotoxicidade dos cimentos obturadores, verifica-se que ainda existem poucos trabalhos que avaliam possíveis danos que estes materiais podem causar ao DNA celular como um fator importante de influência na biocompatibilidade, uma vez que prejuízos ao genoma celular podem diminuir significativamente o potencial de auto-reparação

tecidual, ou em longo prazo, causar o desenvolvimento de neoplasias (Asrari, Lobner, 2003).

Os testes de genotoxicidade são testes *in vitro* designados para detectar produtos e componentes que induzam danos ao material genético das células, tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA, sendo um importante indicador carcinogênico (Shinn-Jyh Ding et al., 2010).

Dentre os testes de genotoxicidade *in vitro* destaca-se o teste de micronúcleo (MNT) (Andrighetti-Fröhner et al., 2006; Ribeiro et al., 2006), utilizado para detecção de mutações cromossômicas, como clastogenes e aneugenes porque os fragmentos de cromossomos e cromossomos atrasados conduzem à formação de micronúcleos na intérfase do ciclo de celular. O dano da membrana celular, inibição de atividades enzimáticas, ou protéicas, síntese de RNA e DNA, ou a simples estimativa do número de células sobreviventes após o tratamento com materiais dentários são alguns indicadores utilizados para análise de modificações na função celular (Schweikl et al., 2004).

Assim, utilizando cultura de fibroblastos de hamster Chinês (V79), este trabalho avaliou a citotoxicidade, através do ensaio de MTT, e a genotoxicidade, pela formação de micronúcleos (MNT) do cimento obturador à base de MTA (MTA Fillapex, Angelus®), comparando-o ao MTA reparador (MTA-Branco, Angelus®), já estudado e considerado biocompatível e ao AH Plus (Dentsply®), cimento obturador bastante utilizado em endodontia.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Ensaios de citotoxicidade**

Muitas pesquisas *in vitro* de citotoxicidade para avaliação dos riscos biológicos de materiais odontológicos são desenvolvidas utilizando culturas celulares provenientes de linhagens obtidas comercialmente, ou a partir de culturas primárias estabelecidas em laboratórios individualmente. Estes estudos são de grande importância para a avaliação prévia do comportamento biológico dos materiais frente aos tecidos (Thomas et al., 1995; Huang, Chang, 2002; Schmalz, 2002; Mantellini et al., 2003; Saidon et al., 2003 Bouillaguet et al., 2004).

A determinação dos efeitos citotóxicos de materiais em cultura de células requer técnicas rápidas, reproduzíveis e capazes de monitorar estes efeitos em função do tempo. Alguns métodos para analisar os efeitos citotóxicos são estáticos ou indiretos, ou seja, eles são designados para avaliar estes efeitos associados somente a processos celulares, como a integridade da membrana celular. Devido às limitações desses métodos, novas metodologias foram criadas a fim de permitirem a execução de pesquisas capazes de determinarem rapidamente o número de células viáveis em culturas celulares (Estrela et al., 2000).

Entretanto, as metodologias dos estudos para análise da citotoxicidade de materiais dentários variam tanto no tipo de teste como no tipo de cultura celular empregada, muitas vezes dificultando a comparação destes materiais quanto as suas propriedades biológicas (Schmalz, 2002).

Huang et al. em 2002, determinaram a citotoxicidade de diferentes cimentos endodônticos em culturas de células do ligamento periodontal humano e em linhagem de células de hamster Chinês (V79). Os cimentos resinosos (AH 26 e AH Plus), os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (Canals, Endomethasone e N2) e um cimento à base de hidróxido de cálcio (Sealapex), foram colocados em contato com o meio de cultura por 1, 2, 3 e 7 dias. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os cimentos AH 26, AH Plus, Canals, Endomethasone, N2 e o Sealapex foram citotóxicos para ambas as culturas de células. O cimento à base de hidróxido de cálcio foi o que apresentou a menor citotoxicidade entre os cimentos testados em ambas as culturas. A citotoxicidade apresentou-se em uma ordem decrescente: N2, Endomethasone, AH 26, AH Plus, Canals e Sealapex.

Asrari, Lobner, 2003, avaliaram a toxicidade dos cimentos retrobturadores de canais radiculares: MTA, amálgama, Super EBA e Diaket sobre cultura de neurônios. Quantidades padronizadas de cada material foram colocadas sobre as culturas, permitindo que o material fosse exposto ao meio de cultura sem causar danos físicos às células. A morte celular foi quantificada através da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH), liberada a partir de células danificadas ou destruídas. A exposição do MTA sobre a cultura imediatamente após a sua manipulação e 7 dias após esta, não causou morte neuronal significativa. Entretanto, a exposição ao amálgama recém manipulado ou 7 dias após, ao Super EBA e ao Diaket resultou em morte neuronal significativa ( $p < 0,05$ ). Assim, todos os materiais testados, com exceção do

MTA, podem induzir a uma neurotoxicidade, mesmo após o tempo de presa de cada cimento ter sido completado.

Miletic et al. (2005) avaliaram a citotoxicidade de dois cimentos endodônticos (RoekoSeal e AH Plus) sobre cultura de fibroblastos dérmicos de ratos L929. Para isso foi utilizado o teste de contagem de células por exclusão com azul de Trypan. Os resultados mostraram que o AH Plus apresentou maior grau de citotoxicidade que o RoekoSeal. Ainda, a citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH 26 e AH Plus foram comparadas pelo teste de difusão de ágar sobre fibroblastos de ratos L929. Após 48 h da exposição, observou-se que ambos os cimentos inibiram a viabilidade celular severamente, apresentando citotoxicidade similares.

Aranha et al., em 2006 avaliaram a citotoxicidade do MTA Branco (Angelus) em cultura de células odontoblastóides MDPC-23. Corpos-de-prova contendo amostras manipuladas do MTA foram imersos em meio de cultura (DMEM) puro após 1 h (presa incompleta) ou 4 h (presa completa) de sua manipulação, onde permaneceram por 24 h ou 7 dias, determinando os seguintes grupos experimentais: G1: 1 h de tempo de presa/24 h de imersão; G2: 4 h de tempo de presa/24 h de imersão; G3: 1 h de tempo de presa/7 dias de imersão; e G4: 4 h de tempo de presa/7 dias de imersão. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, e, após 72 h de incubação, o meio DMEM foi aspirado e substituído pelos extratos obtidos do MTA-Branco. Nos grupos controle (G5 e G6), DMEM puro foi utilizado. O pH dos extratos e o do DMEM puro foram determinados, mostrando baixa variação entre os grupos (de 8,4 até 8,9). O efeito citotóxico foi avaliado por meio da análise colorimétrica do MTT, e os resultados obtidos não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais e entre estes e os controles. A redução do metabolismo para os grupos G1, G2, G3 e G4 foi, respectivamente, de 0,82; 9,6; 4,4 e 0%. A análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou não haver

diferenças entre os grupos experimentais e controles. Os resultados mostraram que o tempo de presa e o de armazenamento do cimento MTA-Branco em líquido não interferiram no metabolismo celular.

A citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH Plus, Epiphany e GutaFlow foi avaliada pelo contato direto dos cimentos sobre fibroblastos 3T3. O ensaio de MTT foi utilizado para verificação da citotoxicidade dos materiais nos períodos de endurecimentos dos mesmos de 24 h e 72 h. Os resultados mostraram que o nível de toxicidade aumentou a partir de 24 h; e que o cimento GutaFlow foi significativamente menos tóxico que o AH Plus e Epiphany. Os autores relataram a importância de continuar a busca por cimentos endodônticos mais biocompatíveis (Bouillaguet et al., 2006).

Lodiene et al., em 2008, analisaram a toxicidade *in vitro* dos cimentos AH Plus, Epiphany, EndoREZ e RoekoSeal. Os cimentos recém espatulados (0 h) e endurecidos (24 h) foram colocados em contato direto com culturas de fibroblastos de ratos (L929) por 2 h em seguida foi realizado o ensaio de MTT. No tempo 0 h, observou-se que o Epiphany e o AH Plus foram severamente tóxicos, sendo que os outros cimentos não apresentaram toxicidade. Entretanto, no tempo 24 h o Epiphany apresentou moderada citotoxicidade e os demais cimentos não foram tóxicos.

Eldeniz et al., 2007, avaliaram a citotoxicidade dos cimentos Sealer RC, Epiphany, EndoREZ, GuttaFlow, Acroseal, AH Plus, RoekoSeal e Apexit sobre cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (HGF) e linhagem de fibroblastos de rato L929. Oito amostras de cada cimento foram alocadas em blocos cilíndricos de teflon estéril (4,4 mm de diâmetro e 2 mm de altura), em seguida as amostras, foram divididas em dois grupos, um contendo os cimentos recém-manipulados e outro grupo contendo amostras do cimento com presa completa (mantidos em estufa por 7 dias a 37 °C). As duas linhagens celulares foram expostas aos extratos dos cimentos não diluídos para a posterior análise

por meio do ensaio de MTT para quantificação da viabilidade celular. A morfologia das células HGF também foi examinada por um microscópio invertido. Os cimentos à base de resina (Epiphany e EndoREZ) e hidróxido de cálcio (Apexit e Acroseal) foram significativamente mais citotóxicos do que os outros materiais. RC Sealer induziu leve citotoxicidade sobre as células HGF em ambos os períodos de endurecimento. Contudo o AH Plus não causou efeitos citotóxicos sobre as mesmas, além disso, as amostras com presa completa estimularam a proliferação celular. RoekoSeal e GuttaFlow também exibiram leve citotoxicidade, sendo este último ligeiramente mais citotóxico para ambas as culturas, especialmente frente as amostras recém-espaturadas.

Nogueira et al., (2008), avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de uma formulação de agregado de trióxido mineral (MTA) associado a diferentes concentrações de clorexidina (CHX) sobre cultura de fibroblastos do ligamento periodontal de camundongos (MPDL). Para isto, corpos de prova com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram preenchidos com cada uma das associações: MTA + água destilada (G1), MTA + CHX 0,06% (G2), MTA + CHX 0,12% (G3), MTA + CHX 0,2% (G4) e MTA + CHX 1% (G5). Os corpos de prova foram imersos individualmente em recipientes contendo 1,1 mL de meio de cultura DMEM, onde permaneceram por 24 h ou por 7 dias para a obtenção dos extratos. As células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas por 48 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Decorrido este período, o meio de cultura de cada compartimento foi substituído por 1 mL dos extratos dos materiais e as células foram incubadas por 24 h. O meio de cultura (DMEM) foi usado como grupo controle negativo (G6). A citotoxicidade foi avaliada pela análise do metabolismo celular (teste do MTT) e pela análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para os extratos de 24 h houve redução do metabolismo celular de 11,87%; 23,63%; 21,87%; 34,64% e 83,01%, respectivamente, para os grupos G1 a G5. Para os extratos de sete dias, a redução foi de

61,35%; 71,45%; 75,43%; 81,26% e 86,13%, respectivamente. Para ambos os períodos de obtenção dos extratos, o metabolismo celular foi estatisticamente menor para todos os grupos experimentais quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). O menor efeito citotóxico foi observado para G1 ( $p < 0,05$ ), seguido pelos grupos G2 e G3, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ( $p > 0,05$ ). Os grupos G4 e G5 apresentaram os maiores efeitos citotóxicos ( $p < 0,05$ ), sendo G5 mais citotóxico do que G4 tanto para o extrato de 24 h quanto de 7 dias. A análise em MEV demonstrou que o aumento da concentração de clorexidina incorporada ao MTA resultou em redução do número de células aderidas ao substrato e marcante alteração na morfologia celular. Concluiu-se que, independente do tempo de obtenção dos extratos, quanto maior a concentração de CHX incorporada ao MTA, mais tóxico o cimento para os fibroblastos (MDPL) e o extrato de 7 dias foi mais citotóxico que o extrato de 24 h.

A citotoxicidade do cimento resinoso à base de metacrilato (MetaSEAL), foi comparada com o a do AH Plus e com um cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Pulp Canal Sealer). Os discos de teflon contendo os cimentos foram colocados em contato direto com células de osteossarcoma de ratos durante 72 h, 1, 2, e 5 semanas. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT. Os resultados mostraram que todos os cimentos foram altamente citotóxicos após 72 h. No entanto, o MetaSEAL e o AH Plus diminuíram sua toxicidade ao longo do tempo (Pinna et al., 2008).

Watanabe et al., em 2008, avaliaram os efeitos do Endo-CPM-Sealer, Sealapex e MTA (Angelus) sobre a viabilidade celular e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por fibroblastos de camundongos (L929). As células permaneceram expostas aos cimentos em estufa por 24 h. Posteriormente a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Cultura de células sem os cimentos foi utilizada como controle negativo e os resultados foram lidos em espectrofotômetro.

Para a avaliação da produção de IL-1 $\beta$  e IL-6, os materiais foram inseridos em poços de fundo chato, condensados e deixados tomar presa por 2 semanas em meio de cultura DMEM. Os fibroblastos foram semeados nos poços contendo os materiais ao fundo. Depois de 24 h de incubação os meios de cultura foram coletados e analisados para IL-1 $\beta$  e IL-6 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Poços sem material, mas com cultura de células serviram como controle. Os cimentos Endo-CPM-Sealer, Sealapex e MTA não reduziram significativamente a viabilidade celular. Todos os materiais estimularam liberação de IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Somente o MTA liberou IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significativa maior que o controle.

Camargo et al., (2009) avaliaram a citotoxicidade de cimentos utilizados em casos de capeamento pulpar sobre cultura de células primárias da polpa humana (HPCs). Os materiais testados foram: cimento de hidróxido de cálcio (Hydro C; Dentsply), MTA cinza (Angelus), MTA-Branco (Angelus), Óleo do Polímero da Mamona (POL) (Poliquil, Araraquara) e o material de controle foi o Vitrebond (3M ESPE Dental Products). Para o ensaio de citotoxicidade foi empregado o teste do cristal violeta, que determina o número de células vivas de uma amostra. As células foram expostas a 200  $\mu$ L dos extratos originais e às seguintes diluições de cada material (1:2; 1:4; 1:8) durante o período de 1 h. Também foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de FACS (citometria de fluxo - *Fluorescence-activated cell sorting*). Concluíram que o extrato original (1:1) do Hydro C reduziu a taxa de sobrevivência celular para 20,5%, e somente 9,8% das células expostas à diluição 1:2 sobreviveram. Diluições do Hydro C foram significativamente mais citotóxicas para as células pulpares em relação aos extratos do POL e para ambos MTA. Não houve diferença estatisticamente significativa para os dois tipos de MTA ( $p > 0,001$ ). Extratos originais do Hydro C assim como a diluição 1:2 dobraram a produção de ROS. No entanto, o

Vitrebond foi considerado o material testado mais citotóxico para todas as diluições, aumentando a produção de ROS em sete vezes. O POL e o MTA foram considerados os materiais menos citotóxicos.

Miranda et al., em 2010, compararam a citotoxicidade de um cimento à base de hidróxido de cálcio e de resina epóxica (MBPc), do MTA cinza e do MTA branco, utilizando difusão em ágar com corante vermelho neutro. Fibroblastos (L929) foram cultivados em placas de cultura de 6 poços. Após o período de incubação de 24 h a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, uma área descolorada ao redor das amostras e do controle positivo pôde ser observada e medida por quadrante. Os valores médios foram comparados e convertidos em graus para qualificar os resultados de acordo com a tabela de graus de citotoxicidade dos Procedimentos Padrões Operacionais (PPO) da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil. As áreas de inviabilidade celular e as alterações morfológicas nas células foram observadas em microscópio de luz invertida. Os resultados mostraram grau 1 (leve) para os dois tipos de MTA ( $p > 0,05$ ) e grau 2 (moderado) para o MBPc ( $p < 0,001$ ). Todas as amostras atenderam os requisitos do ensaio, pois nenhuma das culturas apresentaram citotoxicidade superior ao grau 2 da escala.

Os efeitos da reação inflamatória dos cimentos MTA e Silicato de Cálcio (SC) sobre cultura primária de células humanas da polpa dental foi avaliada por Chen et al., (2010). A citotoxicidade foi verificada pelo ensaio de MTT para quantificar a taxa de sobrevivência celular, em espectrofotômetro de densidade óptica de 570 nm. Ensaio imunistoquímico fluorescente foi realizado para observar a expressão da proteína quinase de adesão focal (FAK) e de marcadores bioquímicos da ciclooxigenase-2 (COX-2) distribuídos pelas células pulpares, para avaliar níveis de inflamação. Os resultados mostraram que o MTA e SC são biocompatíveis para as células pulpares ( $p > 0,05$ ). A QAF foi bem distribuída pelas células pulpares quando em contato com os cimentos. Ambos os materiais induziram reação inflamatória pulpar evidenciada pelo

aumento da expressão da COX-2. Concluiu-se que os cimentos MTA e SC são biocompatíveis para as células primárias da polpa, porém podem estimular reação inflamatória das mesmas.

Damas et al., (2011) compararam a citotoxicidade de dois tipos de MTA-Branco (Pro-Root MTA e MTA-Angelus) sobre fibroblastos dérmicos humanos. Ambos os cimentos permaneceram em estufa durante uma semana após a manipulação. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e expostas aos cimentos testados por um período de 24 h. Para análise da citotoxicidade foi empregado o teste colorimétrico do MTT. Todos os materiais testados demonstraram viabilidade celular > 91,8%. Não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular entre as marcas de MTA.

## **2.2 Ensaios de genotoxicidade**

Estudos dos efeitos genotóxicos e mutagênicos dos cimentos endodônticos têm sido freqüentemente relatados (Geurtsen, Leyhausen, 1997; Ribeiro et al., 2008). Os testes de genotoxicidade são importantes na pesquisa e avaliação do potencial carcinogênico que alguns componentes desses cimentos possam apresentar (Chang et al., 1998; Ribeiro et al., 2005, 2008).

Embora existam muitos testes de genotoxicidade *in vitro*, os 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 detecta 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. No microscópio de fluorescência, as células danificadas assemelham-se a um cometa, com uma cabeça (região do núcleo) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que estão fora do núcleo (Ribeiro et al., 2006).

O teste de micronúcleo (MNT) é um ensaio *in vitro* utilizado para análise da genotoxicidade de materiais e é capaz de detectar aberrações ou mutações cromossômicas além de detectar clastógenos e aneugênicos, pois fragmentos cromossômicos e cromossomos inteiramente isolados levam a formação de micronúcleos durante a mitose do ciclo celular (Schweikl, Schmalz, 2000).

Schweikl e Schmalz (2000) avaliaram a citotoxicidade e a genotoxicidade do cimento AH Plus pelo teste de micronúcleos em células V79. O AH Plus foi testado imediatamente após a manipulação e após 24 h do tempo de presa. O cimento foi diluído em DMSO e em solução salina fisiológica por 24 h. As amostras diluídas em DMSO reduziram a viabilidade das células V79, e o número de micronúcleos foi sete vezes maior em culturas de células tratadas comparadas ao grupo controle (cultura não tratada). Após 24 h, nenhuma mutagenicidade foi observada no AH Plus diluído em DMSO ou solução salina fisiológica. No entanto, os autores evidenciaram a indução de mutações cromossômicas do AH Plus imediatamente após a manipulação.

Huang et al., em 2001, avaliaram a genotoxicidade de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol (Canals, Canals-N e Tubliseal), à base de hidróxido de cálcio (Sealapex) e à base de resina epóxica (Topseal, AH 26 e AH Plus). O estudo foi realizado em cultura de células de carcinoma oral, e o teste do cometa foi utilizado para análise genotóxica. Verificaram o maior nível de dano ao DNA, induzido pelos cimentos resinosos, seguidos pelos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, e nenhum efeito foi constatado pelos cimentos à base de hidróxido de cálcio.

Tai et al., (2002) examinaram o potencial genotóxico de cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e de cimentos resinosos sobre células V79. Primeiramente foi realizado o teste de citotoxicidade através do ensaio de MTT dos cimentos endodônticos (Canals, N2, AH26 e AH Plus) e a genotoxicidade foi avaliada por análise de precipitação do DNA. Os resultados mostraram que todos os cimentos foram citotóxicos para as células. 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. Os resultados sugerem que os cimentos apresentaram diferentes efeitos tóxicos em função do tipo e dos componentes químicos presentes. Os cimentos endodônticos contendo bisfenol e formaldeído em sua composição, provaram ser não somente citotóxicos, mas também genotóxicos.

A formação de micronúcleos e a indução de mutações genéticas através do teste MNT também foram avaliadas sobre células V79 tratadas com oxiranes e siloranes, moléculas constituintes de resinas compostas com baixa contração de polimerização. Estas moléculas são altamente reativas e podem induzir efeitos biológicos adversos sobre o material genético. Pôde-se observar que as oxiranes induziram um número de micronúcleos cinco vezes mais alto que o grupo controle e as siloranes causaram efeitos mais leves na indução de mutações genéticas (Schweikl et al., 2004).

O teste MNT também foi utilizado para avaliar a genotoxicidade de resinas compostas (Solitaire, Solitaire 2, Tetric Ceram, Dyract AP, Definite) testadas em células V79. A resina Solitaire foi a mais tóxica e aumentou em dez vezes o número de micronúcleos em relação ao grupo controle. Os achados deste estudo sugerem que componentes mutagênicos das resinas compostas deveriam ser substituídos por materiais mais biocompatíveis para evitar riscos para a saúde de pacientes (Schweikl et al., 2005).

Embora o MTA e o cimento Portland (CP) sejam utilizados na odontologia como material de preenchimento em cirurgias periapicais e para selar comunicações entre a raiz e os tecidos circundantes, testes de genotoxicidade para avaliação completa dos riscos destes materiais não foram suficientemente realizados até o momento. Ribeiro et al., (2006) estudaram os efeitos genotóxicos do MTA e cimento Portland em linfócitos humanos, através do teste cometa. Os dados mostraram que o teste cometa falhou ao detectar a presença de danos no DNA de linfócitos após o tratamento com ambos os cimentos para concentrações até 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Portanto, esse resultado indica que a exposição celular aos cimentos MTA e Portland não pode ser considerado um fator de indução de lesões sobre o DNA de linfócitos humanos.

Em trabalho semelhante Ribeiro et al., (2006) analisaram a genotoxicidade do MTA-Branco e cinza e do cimento Portland sobre células de linfoma murino e células de ovários de hamster Chinês pelo teste do cometa. Os resultados indicaram que os materiais não foram genotóxicos.

Camargo et al., (2009) avaliaram a genotoxicidade de cimentos utilizados em casos de capeamento pulpar. Os materiais testados foram: cimento de hidróxido de cálcio (Hydro C; Dentsply), MTA cinza (Angelus), MTA-Branco (Angelus), Óleo do Polímero da Mamona (POL) (Poliquil, Araraquara) e o material de controle foi o Vitrebond (3M ESPE Dental Products). O teste de micronúcleos foi realizado sobre culturas de fibroblastos de hamster Chinês (V79) que foram expostas as diluições dos materiais testados por 24 h e ao etilmetano sulfonato EMS; 5 mM (controle positivo) por 24 h. Não foi detectado aumento do número de micronúcleos para as diluições do Hydro C, MTAs e POL. Extratos diluídos do Vitrebond aumentaram cerca de 2,5 vezes o número de micronúcleos.

Shinn-Jyh Ding et al., (2010) testaram a genotoxicidade do MTA e do cimento de Silicato de cálcio (SC) sobre linhagem de células

de osteosarcoma humano (MG63). Para avaliar a taxa de sobrevivência celular foi utilizado o teste de MTT. Na avaliação da genotoxicidade foi empregado o ensaio de precipitação de DNA, que detecta danos causados ao DNA das células após o contato com os extratos ou diluições dos cimentos. Os resultados mostraram que ambos os cimentos foram biocompatíveis sobre as células, não havendo diferença estatisticamente significativa sobre a taxa de viabilidade celular dos mesmos, e que, tanto o MTA como o SC não foram capazes de induzir danos sobre o DNA das células.

### **2.3 Propriedades do cimento AH Plus**

A biocompatibilidade do AH Plus foi avaliada por Almeida (1997) em dentes de cães, após biopulpectomia e obturação dos canais radiculares. Após 90 dias, os resultados histológicos mostraram formação de selamento biológico completo no ápice radicular em 12,5% dos casos e selamento parcial em 75% dos casos, sendo esse selamento sempre em contato direto com o cimento obturador. Nas duas situações, o tecido neoformado era mineralizado, do tipo cementóide e continha cementócitos em seu interior e numerosos cementoblastos em sua periferia. O tecido conjuntivo estava íntegro e o ligamento periodontal apresentava espessura normal e ausência de células inflamatórias.

Siqueira et al., 2000, estudaram a atividade antimicrobiana e o escoamento dos cimentos obturadores Kerr Pulp, Canal Sealer EWT, Grossman's Sealer, ThermalSeal, Sealer 26, AH Plus e Sealer Plus, por meio da difusão em ágar. No teste de escoamento os cimentos foram colocados entre duas placas de vidro com um peso de 500 g colocado sobre as mesmas. Os diâmetros dos discos formados

foram registrados. Todos os cimentos de canais radiculares testados mostraram alguma atividade antimicrobiana, contra a maioria dos microrganismos. Os resultados revelaram que o AH Plus e o Kerr Pulp Canal Sealer EWT, apresentaram valores superiores de escoamento.

O AH Plus é um cimento à base de resina epóxica que apresenta alta fluidez, por isso penetra nas micro irregularidades presentes no interior do canal radicular, além de possuir bom escoamento e elevado tempo de polimerização. Essas propriedades favorecem maior imbricação mecânica entre o cimento e a dentina (Sousa-Neto et al., 2002), promovendo maior resistência a remoção ou deslocamento do material da superfície da dentina, e por conseguinte menor infiltração marginal (Timpawat et al., 2001; Kopper et al., 2003).

Pappen et al., (2005) avaliaram a infiltração coronária em 60 raízes instrumentadas pela técnica crown-down. Estas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos (n=30) e obturadas com cones de gutapercha. No grupo 1 o cimento obturador utilizado foi o Sealapex e no grupo 2 utilizou-se o AH Plus. Após confecção do espaço para contenção intra- radicular, as raízes foram impermeabilizadas com cianoacrilato e submetidas ao processo de infiltração por corante de azul de metileno a 2% por 24 horas. Os dados foram mensurados de acordo com a porcentagem da área preenchida com corante. Os resultados mostraram que os cimentos AH Plus e Sealapex não influenciaram na infiltração coronária, porém a infiltração produziu contaminação dos tecidos periapicais, resultando em insuficiência do tratamento endodôntico.

A reação inflamatória do tecido ósseo de mandíbulas de porcos guínea foi analisada por meio de implantes intra-ósseos de tubos de teflon preenchidos com os cimentos endodônticos AH Plus, EndoREZ e Epiphany, nos períodos de 4 e 12 semanas. Sousa et al., 2006 verificaram que em ambos os períodos a reação inflamatória ao EndoREZ foi considerada severa. O AH Plus exibiu uma reação inflamatória severa

a moderada, enquanto para o Epiphany foi observada reação inflamatória leve.

Yucel et al., (2006) compararam a infiltração bacteriana em dentes obturados pela técnica da condensação lateral com AH Plus, AH 26, Sealapex e Ketac-Endo. Foram utilizados 100 dentes, divididos em 4 grupos experimentais e 2 grupos controles. A primeira avaliação foi realizada após 30 dias, e a segunda após 60 dias. Na primeira avaliação, a infiltração bacteriana foi de 85% para os grupos do AH Plus e do Ketac-Endo, de 80% para o Sealapex e 75% para o AH 26. Na segunda avaliação a infiltração bacteriana foi de 100% para o cimento AH Plus, Ketac-Endo e Sealapex, enquanto o AH 26 apresentou 95% de infiltração. Não houve diferença estatística entre os cimentos em 30 e 60 dias e nenhum cimento foi capaz de impedir a infiltração bacteriana.

Reações do tecido conjuntivo de camundongos foram avaliadas após implantação subcutânea de tubos de polietileno preenchidos com quatro cimentos endodônticos (Endofill, Endomethasone, Sealer 26 e AH Plus). As reações inflamatórias causadas pelos cimentos foram avaliadas por 1, 14 e 30 dias após a implantação, e foram classificadas em discreta, moderada ou intensa. As análises microscópicas revelaram que o Endomethasone mostrou o melhor comportamento biológico em todos os períodos, seguido do Sealer 26 e AH Plus, que produziram efeito irritante somente no período inicial. O cimento Endofill causou severas irritações com reações inflamatórias variando de moderada a intensa em todo período experimental (Batista et al., 2007).

A atividade antimicrobiana de um novo cimento endodôntico à base de resina (SuperBond, SB) foi comparada a outros cimentos convencionais (Sealer, Sealapex, AH Plus, RoekoSeal, Canals N e ProRoot MTA). Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Os microrganismos foram corados e as zonas

de inibição de crescimento foram mensuradas. A atividade antimicrobiana do SB foi significativamente menor em relação aos outros cimentos. Porém, o AH Plus exibiu a maior atividade antimicrobiana (Yasuda et al., 2008).

Tanomaru-Filho et al., (2009) avaliaram a reparação apical após obturação do canal radicular com diferentes cimentos endodônticos: Intrafill, AH Plus, Roeko Seal e Sistema Resilon/Epiphany. Sessenta e quatro canais radiculares provenientes de dentes de cães foram instrumentados com limas Kerr e irrigados com solução de hipoclorito de sódio 1%. A obturação foi realizada na mesma sessão pela técnica da condensação lateral ativa. Após 90 dias os animais foram sacrificados e os tecidos foram processados para análise histopatológica. Os parâmetros avaliados foram: presença de processo inflamatório, reabsorção de tecido mineralizado e deposição apical por tecido mineralizado. Os resultados demonstraram que o Intrafill pouco estimulou a reparação apical e periapical comparado com os outros cimentos ( $p < 0.05$ ). AH Plus, Roeko Seal e Epiphany obtiveram comportamentos similares e resultados satisfatórios, e podem ser consideradas boas opções para o uso clínico em endodontia.

Neto et al., (2010) avaliaram *in vivo* a biocompatibilidade dos cimentos AH Plus, Acroseal e EndoREZ, após a implantação em tecido subcutâneo de 16 ratos Wistar. Os cimentos foram colocados no interior de tubos de polietileno e estes foram implantados em locais específicos no subcutâneo do dorso dos animais. Os blocos de tecidos foram removidos após 24 h, 72 h, 7 e 21 dias, processados histologicamente e analisados através da microscopia óptica. Os resultados indicaram que todos os cimentos induziram a reações inflamatórias discretas, que diminuíram ao longo do experimento. O cimento Acroseal apresentou o melhor comportamento biológico, seguido pelo AH Plus e EndoREZ.

## 2.4 Composição, tempo de presa, solubilidade, e pH do MTA

O MTA foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia, USA) por Torabinejad et al.(1993) e desde então tem sido um material extensivamente pesquisado. Consiste em 50–75% de óxido de cálcio e 15–25% de dióxido de silicato. Estes dois componentes juntos compreendem 70-95% do cimento e quando são misturados produzem silicato tricálcio, silicato dicálcio, alumínio tricálcio e aluminoferrite tetracálcio. Com a adição de água, o cimento sofre hidratação formando um gel de silicato hidratado (Camilleri, Pitt Ford, 2006).

Torabinejad et al., em 1995, determinaram a composição química, o pH, a radiopacidade, o tempo de presa, a resistência à compressão e a solubilidade do MTA. Compararam algumas destas propriedades com as do amálgama, Super-EBA e IRM. A análise espectrométrica mostrou que os principais elementos presentes no MTA foram os íons cálcio e fósforo. Após a presa, o MTA estava dividido em 2 fases, uma de óxido de cálcio e outra de fosfato de cálcio, e em análises posteriores a primeira se apresentou como cristais discretos e a última como uma estrutura amorfa, de aparência granular. A composição média dos prismas foi de 87% de cálcio e 2,47% de sílica e o restante composto por oxigênio. Nas áreas de estrutura amorfa foram observados 49% de fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica. O pH do MTA logo após a mistura foi de 10,2 e após 3 horas aumentou para 12,5, permanecendo constante. A radiopacidade média do MTA foi de 7,17 mm/Al, superior ao Super-EBA e ao IRM. O amálgama apresentou o menor tempo de presa (4 min), seguido pelo IRM (6 min), Super-EBA (9 min) e MTA (2 h 45 min). Nas primeiras 24 h, o MTA apresentou menor resistência à compressão, de 40 MPa, que aumentou para 67 MPa após 21 dias, superando a do IRM (57,4 MPa) e ficando próxima a do Super-EBA (78,1 MPa). O amálgama foi o mais resistente nos dois períodos

avaliados. Nas condições experimentais estudadas, somente o IRM apresentou solubilidade.

Deal et al., (2002) compararam as propriedades químicas e físicas do ProRoot MTA, cimento Portland e de um material experimental, o MTA de presa rápida. Para o teste físico foi empregada espectroscopia de energia dispersa e o teste de inductibilidade de plasma para análise química. O pH e o tempo de presa foram avaliados segundo as normas da ANSI/ADA, especificação #96. A proporção pó/líquido utilizada foi de 1g/0,35 mL para todos os materiais. Os materiais testados apresentaram composição química semelhante, inclusive em relação à presença do bismuto em uma proporção de 20,1% para o ProRoot MTA, 17,3% para o cimento Portland e 15,5% para o MTA de presa rápida. Imediatamente após a manipulação, o pH foi de 11,72 para o ProRoot MTA, 11,74 para o cimento Portland e 11,69 para o MTA de presa rápida. Depois de 30 min foi de 12,3 para os dois primeiros e não medido para o MTA de presa rápida, por estar no estado sólido. O tempo de presa foi de 156 min para o ProRoot MTA, 159 min para o cimento Portland e 17 min para o MTA de presa rápida. Segundo os autores o MTA de presa rápida apresentou propriedades químicas semelhantes às dos outros materiais, porém com tempo de presa significativamente reduzido.

FridLand, Rosado, em 2003, avaliaram a solubilidade e a porosidade do MTA manipulado em diferentes proporções: 0,26; 0,28; 0,30 e 0,33 g de água para 1 g de pó. O teste de solubilidade seguiu as normas da ISO 6876 e a especificação #30 da ADA e a porosidade foi observada por MEV. O pH da água onde os espécimes foram imersos no teste de solubilidade também foi medido. Os resultados mostraram que o grau de solubilidade e a porosidade aumentaram a medida que a proporção de água/pó foi aumentada. Os valores de solubilidade em porcentagem foram: 1,76; 2,25; 2,57 e 2,83, para as respectivas proporções, ficando dentro da recomendação da ADA, inferiores a 3% do peso inicial. Na MEV foram observadas bolhas de ar, poros e estrutura

capilar que poderiam estar relacionados com a porosidade do material. O pH das soluções ficaram entre 11,94 e 11,99. Os resíduos solubilizados na água foram preparados para análise química em espectrofotômetro de absorção atômica, revelando o cálcio como o principal componente liberado (482 mg/L), seguido pelo potássio (45 mg/L), sódio (21,40 mg/L), sulfato (5,20 mg/L) e ferro (4,96 mg/L).

A cor cinza do MTA original pode causar manchamento nos dentes, principalmente quando o cimento for utilizado como selador de perfurações ou protetor pulpar direto em dentes anteriores. Para minimizar este inconveniente foi desenvolvido o MTA de coloração branca (MTA-Branco) (Perez et al., 2003). Porém, ambos MTAs apresentam diferenças na concentração de alumínio, magnésio e compostos de ferro, sendo que o MTA branco possui apenas 1,2% de óxido ferroso (FeO), constituinte este, responsável pela coloração escura do MTA cinza. Apesar da composição diferente, estudos revelam que os mecanismos de ação do MTA cinza e branco são similares (Camilleri, Pitt Ford, 2006; Roberts et al., 2008).

Diamanti et al., em 2003, compararam a composição química, o pH e as características da superfície do MTA cinza em relação ao MTA branco. Os resultados da composição química avaliada pela difração de raios-X mostraram semelhanças ao cimento Portland, porém com diferenças entre os dois materiais. Não foi detectada presença de óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) no MTA branco e sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>) no MTA cinza. O pH da suspensão imediatamente após a mistura de 1g do MTA branco com 20 mL de água destilada foi elevado e mantido constante durante um período de 2 h (11,32 - 11,38). Ambos, MTA cinza e branco apresentaram superfície rugosa, Ra=1,94 µm e Ra=1,90 µm, respectivamente. Concluíram que os MTAs são cimentos Portland, que apresentam elevado pH e superfície rugosa após a presa.

Duarte et al., em 2004, avaliaram o pH e a liberação de íons cálcio do ProRoot MTA e do MTA-Branco (Angelus) após 3, 24, 72 e

168 h, por meio de pHmetro e espectrofotômetro de absorção atômica. Utilizaram 5 tubos de plástico de 1 cm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno, preenchidos com cada material. Os tubos foram imersos em 10 mL de água deionizada, e esta foi trocada após cada período. Em todos os períodos, o MTA Angelus forneceu valores discretamente maiores de pH (9,52; 9,37; 9,32 e 9,30) e de liberação de íons cálcio (1,66; 1,38; 0,88; 0,93 mg/dL) quando comparado ao ProRoot MTA (9,32; 9,07; 9,02; 9,22 e 1,23; 0,96; 0,83; 0,92 mg/dL, respectivamente). Os valores de pH e liberação de cálcio para ambos os cimentos foram maiores durante as 3 primeiras horas, depois tenderam a diminuir.

Santos et al., em 2005, compararam a liberação de íons cálcio, pH, e condutividade elétrica de um novo material, desenvolvido a partir do cimento Portland, em relação ao MTA Angelus. Cinco tubos plásticos, com 1 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento, preenchidos com os materiais, foram imersos em 10 mL de água deionizada, a qual foi analisada após 24, 48, 72, 96, 192, 240 e 360 h. A quantificação dos íons cálcio liberados foi realizada por meio de um espectrofotômetro de absorção atômica. A maior liberação de íons cálcio ocorreu após 24 h, principalmente oriundos do cimento experimental, e com o passar do tempo ocorreu diminuição dessa liberação, sendo semelhante para ambos os materiais. O dois cimentos liberaram íons cálcio e hidroxilas até o período de 360 h quando estocados em meio aquoso. Em relação ao pH, ambos atingiram o pico de alcalinidade (próximo a 10,5).

Yildirim et al., (2010) investigaram a influência da espessura da cavidade retrógrada e da *smear layer* na capacidade de selamento apical do MTA. Sessenta dentes unirradiculares foram instrumentados e divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais (15 amostras, cada) e 2 grupos controle (5 amostras, cada). Nos grupos 1 e 2 (*smear layer* presente), os dentes foram irrigados apenas com 5,25% NaOCl. Nos grupos 3 e 4 (*smear layer* ausente), o dentes foram irrigados com NaOCl 5,25% e EDTA a 17%. Além disso, nos grupos 1 e 3 foram

preparadas cavidades de 3 mm. Nos grupos 2 e 4 foram preparadas cavidades de 5 mm. Todas as cavidades foram preenchidas com MTA. Foi aplicado esmalte de unha nas superfícies externas de todas as raízes para impedir a infiltração lateral. As amostras foram esterilizadas em óxido de etileno por 12 h e 3-4 mm da região apical das raízes foi imersa em meio de cultura BHI com indicador vermelho de fenol. Na porção coronária de cada espécime foi inoculada uma suspensão de *E. faecalis* a cada 48 h. A infiltração bacteriana foi monitorada a cada 24 h durante 4 semanas. Não houve diferença significativa nos níveis de infiltração bacteriana entre os grupos experimentais em 4 semanas. Não houve diferença significante entre os grupos quanto à espessura das cavidades. A remoção da *smear layer* causou maior microinfiltração apical do que quando a *smear layer* foi mantida. Os autores concluíram que a espessura da cavidade preenchida com MTA (3 ou 5 mm) não teve influência na infiltração bacteriana apical e que a remoção da *smear layer* pode não ser necessária em retro-cavidades preenchidas com MTA.

A influência do processo de mineralização sobre a resistência adesiva do MTA (Dentsply), MTA-Branco (Angelus), BIO MTA (Angelus) e do cimento Portland com ou sem cloreto de cálcio, foi avaliada por Reyes-Carmona et al., (2010). Demonstraram que a interação do MTA e do cimento Portland com a dentina em PBS, promoveu um processo de mineralização, que levou à formação de uma camada interfacial dotada de estruturas comunicantes semelhantes às junções comunicantes presentes na interface dentina-cimento. Discos de dentina com cavidades padronizadas foram preenchidos com MTA, MTA-Branco, BIO MTA, cimento Portland branco + 20% de óxido de bismuto (PC1), ou PC1 + 10% de cloreto de cálcio (PC2). Os espécimes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1) o cimento em contato com algodão molhado por 72 h; 2) ou imersos em PBS por 2 meses. A resistência adesiva foi medida com a máquina de teste Instron (modelo 4444; Instron Corp, Canton, MA), e as superfícies radiculares fraturadas

foram observadas por MEV. Todas as amostras imersas em PBS apresentaram resistência significativamente maior ao deslocamento do que a observada para as amostras em contato com algodão molhado. Os MTAs apresentaram uma resistência ao deslocamento significativamente maior em relação aos cimentos Portland. Concluiu-se que o processo de biomineralização influenciou positivamente a força de resistência adesiva dos cimentos à base de MTA.

## **2.5 Mecanismo de ação do MTA**

Holland et al. (2001) demonstraram que o mecanismo de ação do MTA é semelhante aos dos cimentos à base de hidróxido de cálcio. Os íons cálcio que são liberados na reação química desses cimentos favorecem a mineralização, pois reagem com o gás carbônico tecidual formando carbonato de cálcio ou cristais de calcita, o qual segundo Seux et al. (1991), participa como matriz para o processo de calcificação.

Os íons cálcio liberados funcionam como potentes reguladores das funções celulares nos tecidos mineralizados, participando da remodelação óssea, processos regenerativos, expressão, proliferação e recrutamento de células blásticas, além de estimular a proliferação da fosfatase alcalina (FAL) por osteoblastos (Koh et al., 1998; Mizuno, Banzai, 2008). Esta enzima é uma hidrolase capaz de remover grupos fosfatos de um grande número de moléculas, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides. No metabolismo ósseo, a FAL age controlando a concentração dos inibidores da mineralização como os pirofosfatos inorgânicos, através do aumento da concentração local de íons fosfatos, removendo o fosfato de outras proteínas e/ou possivelmente atuando

como transportador iônico. Os íons fosfatos que ficam livres reagem com os íons cálcio, para formar um precipitado na matriz orgânica, o fosfato de cálcio, que é a unidade molecular da hidroxiapatita. Como o próprio nome sugere, essa enzima é mais ativa em meio alcalino. Neste contexto, o hidróxido de cálcio ativa a fosfatase alcalina a partir de seu elevado pH, o que pode iniciar ou favorecer a mineralização (Estrela et al., 1994; Ustáriz et al., 1998).

A indução e formação de tecido mineralizado pelo MTA, foi confirmado por Tziafas et al., (2002), em experimento realizado em dentes de cães, que avaliou a resposta inicial das células pulpares e o início da formação de dentina reparadora após aplicação de MTA em polpas expostas. No local da exposição foi colocado ProRoot MTA e as cavidades foram restauradas com amálgama. As reações do tecido pulpar foram avaliadas por microscopia óptica e eletrônica após intervalos de 1, 2 e 3 semanas. Uma zona homogênea de estruturas cristalinas foi inicialmente encontrada ao longo da interface polpa-MTA, enquanto em estreita proximidade com os cristais foram observadas células pulpares. Além disso, foi encontrada deposição de tecido duro em contato direto com o cimento em associação com as estruturas cristalinas em todos os dentes. Os experimentos indicam que o MTA é um eficiente material de proteção pulpar, capaz de estimular a formação de dentina reparadora ainda no início do processo de cicatrização de feridas pulpares.

A quantificação de íons cálcio liberada a partir do MTA e do cimento à base de hidróxido de cálcio (Dycal) foi avaliada por Takita et al., 2006, em cultura de células humanas da polpa dental (HDP). Contudo, para confirmar se os efeitos do MTA sobre a proliferação celular poderiam ser atribuídos à liberação de íons cálcio, o crescimento celular foi medido na presença de cloreto de cálcio, que serviu como uma fonte de íons cálcio exógena na ausência de MTA. O controle positivo consistiu de culturas celulares sem o contato com os cimentos. A proliferação celular

foi medida durante 14 dias, e a concentração de íons cálcio liberada pelos cimentos testados foram avaliadas através de kits de contagem de células. Os resultados mostraram que o MTA estimulou a proliferação celular durante todo o período avaliado, e o mesmo não foi observado para o Dycal. Entretanto, o número de íons cálcio liberados pelo MTA foi significativamente maior quando comparado ao Dycal. O estudo também comprovou que a proliferação celular foi dose-dependente da quantidade de íons cálcio liberada.

Estudos mostram que o cálcio liberado por esses cimentos, atravessa a membrana das células por despolarização ou pela ativação de canais de cálcio e, que, provavelmente, este íon desempenha um papel importante no processo de reparação da polpa. Além, de ser necessário para a diferenciação e mineralização de células pulpares, pois a presença de íons cálcio em altas concentrações ativa a ATP (adenosina trifosfato), que exerce importante função no processo de mineralização. Além disso, o cálcio estaria relacionado, especificamente, com a modulação de osteopontina e de proteína óssea morfogenética-2 durante o processo de calcificação de células pulpares (Takita et al., 2006; Mizuno, Banzai, 2008).

Mizuno e Banzai (2008) reforçaram o papel do cálcio no processo de reparação óssea. Demonstraram que a liberação deste íon a partir do cimento de hidróxido de cálcio, estimula a síntese de fibronectina na polpa dentária e que este processo é dose-dependente, isto é, quanto maior a quantidade de cálcio liberada, maior a síntese de fibronectina. Por sua vez, a fibronectina poderia induzir a diferenciação de células da polpa dentária em células formadoras de tecido mineralizado, sendo estas responsáveis pela formação de pontes de dentina, através do contato entre células.

O mesmo ocorre para o tecido conjuntivo quando tubos de dentina contendo cimento à base de hidróxido de cálcio ou MTA no seu interior foram implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos.

Observou-se uma rica rede extracelular de fibronectina em contato com os cristais de calcita precipitados nos tubos devido à reação entre o tecido e o cimento. Seux et al., (1999) sugere que tanto a fibronectina quanto os cristais de calcita funcionam como agentes iniciantes no processo de formação de uma barreira por tecido mineralizado.

D'Anto et al., (2010) estudaram a relação do MTA no processo de adesão, proliferação e migração em cultura de células humanas da medula óssea (derivadas de células mesenquimais). A microscopia eletrônica de varredura evidenciou atividade de adesão e de propagação celular sobre a superfície do MTA. A proliferação das células também foi significativamente estimulada por este cimento em relação ao grupo controle. O estudo também demonstrou importante atividade do MTA no processo de migração dessas células, através do ensaio de transposição. Segundo os autores, este estímulo sobre a migração celular pode ser considerado fator relevante sobre o mecanismo de indução e reparação tecidual por parte do MTA.

## **2.6 Biocompatibilidade do MTA**

Koh et al., (1998) avaliaram a morfologia de osteoblastos na presença de MTA e a produção de citocinas por estas células. Os osteoblastos foram semeados em placas de Petri e incubados por 1 a 7 dias. Amostras do MTA e de IRM foram colocadas em diferentes placas e os espécimes foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura. As placas usadas para avaliação da produção citocinas possuíam os materiais testados e nas placas controle havia somente células. A média foi realizada através do teste de ELISA. Através da análise microscópica, observaram-se células com aspecto normal em contato com o MTA de 1 a

3 dias, entretanto as células que estavam próximas ao IRM encontravam-se arredondadas. O teste ELISA mostrou a presença de interleucinas nas placas com MTA, diferentemente das placas com IRM onde estas não foram detectadas. Concluíram que o MTA ofereceu substrato biológico para células ósseas e estimulou a produção de interleucinas.

Economides et al., 2003 avaliaram a resposta dos tecidos perirradiculares de dentes de cães quando em contato com o MTA. As polpas foram removidas, os canais radiculares foram preparados e obturados com guta-percha e cimento. Na mesma sessão, foi realizada a ressecção do ápice radicular, e o MTA e IRM foram usados como materiais retrobturadores. As reações dos tecidos perirradiculares foram avaliadas histologicamente durante cinco semanas. O tecido duro formado na superfície do MTA foi examinado por microscopia eletrônica de varredura. O resultado histológico da reação tecidual característico ao MTA foi a presença de tecido conjuntivo após a primeira semana pós-operatória. O tecido cicatricial primário formado após a colocação do MTA foi caracterizado pela presença de um tecido duro em formação crescendo progressivamente a partir da periferia da raiz em direção à interface do MTA-dentina. Entretanto, não foi observado formação de tecido duro sobre o IRM sob as mesmas condições. Os resultados mostraram que o MTA é um material biocompatível capaz de estimular a reparação tecidual perirradicular. No entanto, a natureza dos tecidos recém-formados requer maiores explicações.

Yaltirik et al., em 2004, avaliaram as reações do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos Wistar quando expostos ao ProRoot, MTA (Dentsply), e Oralloy (Coltene) (amálgama com alto teor de cobre). Estes materiais foram colocados no interior de tubos de polietileno e implantados no tecido conjuntivo dorsal dos animais. Posteriormente biópsias dos tecidos foram coletadas e examinadas histologicamente 7, 15, 30, 60 e 90 dias após o implante. A presença de inflamação, tipos de células predominantes, calcificação e espessura de tecido conjuntivo

fibroso foram registradas. Necrose e formação de calcificação também foram registradas. De acordo com os resultados ambos os materiais foram bem tolerados pelos tecidos ao longo dos 90 dias de avaliação. Porém as análises evidenciaram notável presença de calcificação distrófica no tecido conjuntivo adjacente ao MTA, o que é condizente com a hipótese de indução e formação de tecido duro por este material.

Balto et al., em 2004, verificaram a morfologia e capacidade de adesão de fibroblastos humanos do ligamento periodontal expostos ao MTA através de microscopia eletrônica de varredura. O cimento foi colocado no ápice radicular de 30 dentes humanos unirradiculares. Posteriormente, as raízes obturadas foram seccionadas a fim de obterem-se dois cortes. Os espécimes foram divididos em dois grupos experimentais (n=15), um grupo obturado com MTA recém-manipulado e o outro obturado com MTA de presa completa. Para cada grupo, cinco metades radiculares foram observadas em diferentes períodos (4, 8 e 24 h). Duas lâminas de vidro foram utilizadas para observação microscópica do grupo controle negativo (fibroblastos não expostos ao cimento) nos mesmos períodos. Os resultados mostraram morfologia inalterada para as células do grupo controle negativo. Além de poucas células aderidas a superfície do cimento recém-manipulado e uma grande quantidade destes fibroblastos apresentavam superfície rugosa. Porém foi constatada a presença de células exibindo morfologia semelhante ao controle negativo e com superfícies lisas e bem aderidas ao MTA de presa completa. Esses resultados sugerem que a quantidade e a qualidade de células aderidas ao material retrobturador podem ser utilizadas como critério para avaliar a citotoxicidade de um material.

Estudos que avaliaram a reação tecidual perirradicular ao MTA quando utilizado como material retrobturador mostraram a ocorrência de pequena inflamação periapical, formação de cápsula fibrosa e a formação de novo cimento no periápice quando em contato com a superfície do material (Torabinejad et al.,1995; Bernabe et al., 2005).

Quando utilizado como material de proteção pulpar direta, o MTA foi capaz de induzir a formação de uma barreira de tecido duro sobre a polpa, produzir menor reação inflamatória, além de criar barreiras com espessuras significativamente maiores em comparação ao cimento de hidróxido de cálcio (Bernabe et al., 2005).

Estudos realizados por Watanabe et al., (2008), compararam a resposta tecidual do tecido subcutâneo de rato após implante de tubos de polietileno preenchidos com Endo-CPM-Sealer, Sealapex ou MTA (Angelus). As avaliações foram realizadas após 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Foi realizada análise qualitativa e quantitativa das reações; concluíram que os cimentos Endo-CPM-Sealer, Sealapex e MTA causaram reação moderada no tempo experimental de 7 dias, que diminuiu com o tempo. A resposta foi similar entre os grupos controle, Endo-CPM-Sealer e MTA no tempo experimental de 30 dias. Aos 60 dias todos os grupos foram semelhantes ao controle. Mineralizações e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas em todos os materiais. Concluíram que o Endo-CPM-Sealer foi biocompatível e estimulou a mineralização. Granulações birrefringentes para luz polarizada e Von Kossa positivo também foram observadas próximas da abertura dos tubos para o grupo do MTA, justificando a deposição de cristais de calcita através da reação do óxido de cálcio presente no MTA com a água ou fluídos do tecido formando hidróxido de cálcio.

Em estudo semelhante Gomes-Filho et al., (2011) analisaram a resposta inflamatória tecidual do osso alveolar de ratos após implantação de tubos de polietileno contendo MTA experimental fotopolimerizável ou MTA (Angelus) por meio de análises imunoistoquímicas e de fluorescência. As análises foram realizadas após 30 dias. Os resultados mostraram que para ambos os materiais as respostas inflamatórias teciduais foram sutis, caracterizada por tecido conjuntivo organizado e pela presença de macrófagos e células multinucleadas, além dos dois cimentos terem estimulado a cicatrização

óssea. Porém, áreas de mineralização distrófica somente foram observadas para o MTA convencional.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Avaliar em cultura de fibroblastos (V79) o metabolismo celular (citotoxicidade) e a formação de micronúcleos (genotoxicidade) após contato das células com os extratos dos cimentos obturadores de canais radiculares AH Plus, MTA Fillapex e do cimento reparador de MTA.

## **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**

Para o experimento foram utilizados fibroblastos pulmonares de hamster Chinês (V79), (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ). As células foram semeadas em meio de cultura previamente preparado e, constituído por meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB) além de, solução de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) (Figura 1a). A cultura celular foi realizada em frascos próprios para cultivo (Prolab, São Paulo, Brasil) (Figura 1b). Em seguida, estes foram levados para estufa a 37° C com tensão de CO<sub>2</sub> 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).

Após esse cultivo, as células foram semeadas em placas com 96 poços (Prolab, São Paulo, Brasil), onde receberam posteriormente os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados serão descritas a seguir.



Figura 1 - a) meio de cultura (DMEM), PBS e tripsina; b) frasco utilizados para realização de cultura de células.

#### 4.1.1 Descongelamento

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, Brasil). Em um frasco grande para cultura de célula (garrafa 75 cm<sup>2</sup> – 270 mL), foram pipetados 10 mL de meio de cultura preparado; esse procedimento foi realizado com

antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada.

No livro de registros do banco de células foram selecionados o puxador e a caixa do tambor de nitrogênio (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) que continham as células desejadas (Figura 2a). Um tubo criogênico (Prolab, São Paulo, Brasil) (Figura 2b) foi removido e levado imediatamente para o banho-maria (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil) até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo foi despejado no frasco de cultivo contendo meio de cultura.

O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça) para verificação da presença de células e em seguida à estufa a 37° C com tensão de CO<sub>2</sub> 5% (Thermo Fisher Scientific Inc, United States).



Figura 2 – a) remoção do puxador com as caixas do tambor de nitrogênio; b) tubos criogênicos contendo células V79.

#### 4.1.2 Troca de meio

A cada 48 horas o meio de cultura celular foi trocado. O frasco de cultivo contendo as células foi removido da estufa, e as células foram verificadas no microscópio. O meio de cultura foi aspirado com bomba a vácuo (Quimis, Aparelhos Científicos, Brasil), e em seguida as células foram lavadas com 5 mL de PBS (solução salina de tampão de fosfato) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil) para remoção de células mortas. Um novo meio de cultura foi então adicionado ao frasco, e este foi levado novamente à estufa.

#### 4.1.3 Subcultura

Quando as células cresceram a ponto de ocupar quase todo o frasco (80% de confluência) após um período médio de cultivo entre 36 a 48 h, foi necessário realizar a subcultura, passando as células de um frasco de cultivo para dois ou mais, de acordo com o crescimento celular.

As células foram removidas da estufa e levadas à capela de fluxo laminar, o meio de cultura presente no frasco de cultivo foi aspirado. Em seguida, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e este foi aspirado por conseguinte. Foram adicionados ao frasco 3 mL de solução de tripsina 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), utilizada para destacar as células. Este frasco foi levado à estufa por 5 minutos e, em

seguida, leves batidas na parte inferior do frasco foram realizadas, para auxiliar na remoção das células. Logo após foram adicionados 6 mL de meio fresco sobre as células, neutralizando a tripsina.

Todo o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo Falcon, e este foi levado à centrífuga (Quimis Aparelhos Científicos, Brasil) por 5 minutos a 1000 rpm, e, ao ser retirado, observou-se a formação de um precipitado de células, denominado *pellet* (Figura 3b). O sobrenadante foi novamente aspirado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio fresco.

Após bem homogeneizada, a suspensão foi dividida em dois ou mais frascos de cultivo de mesmo tamanho, contendo 10 mL de meio de cultura cada. 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.

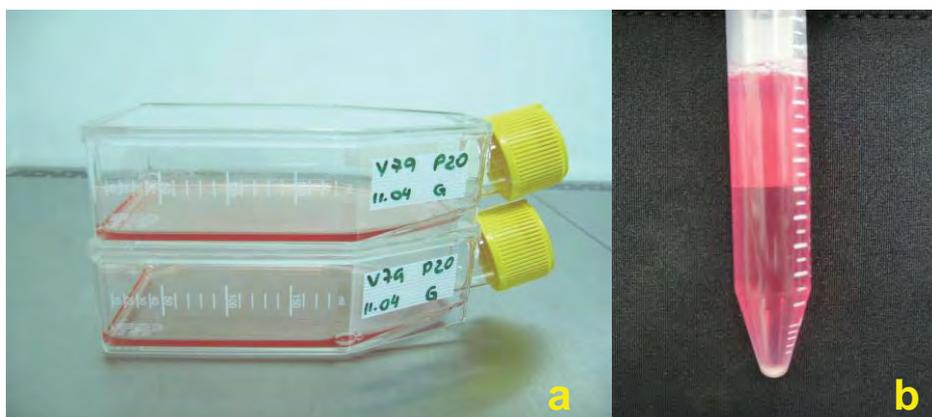


Figura 3 – a) Divisão da suspensão celular em dois frascos de cultivo durante a subcultura; b) precipitado celular (*pellet*).

#### 4.1.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada antes do plaqueamento para que a mesma quantidade de células fosse colocada em cada poço das placas. Foram realizados os mesmos passos da subcultura até a obtenção do *pelet*; sendo que nesse caso, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio fresco. Dessa suspensão, foram retirados 10  $\mu$ L, quantidade necessária levada à câmara de Neubauer (Labor Optik GmbH, Germany), onde pôde ser realizada a contagem do número de células ao microscópio (Figura 4).

Para obtenção da quantidade de células por mL, foi utilizada a seguinte fórmula:

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

Onde **C** corresponde à média das células viáveis encontradas nos quadriláteros periféricos presentes na câmara de Neubauer. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células em 200  $\mu$ L de meio em cada poço.



Figura 4 – Preparo para realização da contagem celular: a) 10  $\mu$ L de meio sendo colocados no interior do compartimento da câmara de Neubauer, b) câmara de Neubauer para contagem celular.

## **4.2 Plaqueamento**

Foram utilizadas 3 placas de 96 poços para cada período de avaliação. Em cada placa, foram utilizados quatro espécimes (poços) por diluição. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, 12 espécimes por período, para cada grupo experimental.

As placas foram levadas à estufa a 37° C onde permaneceram por 24 horas, até o momento da exposição aos meios de cultura condicionados (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 do crescimento das células cultivadas sem a aplicação dos meios condicionados em teste. Para obtê-la, as células plaqueadas foram submetidas à avaliação através do ensaio com MTT nos períodos de 12, 48 e 72 horas. Foram avaliados doze espécimes para cada período, que corresponderam ao grupo controle.

#### 4.4 Preparo dos extratos originais

##### 4.4.1 Divisão dos grupos experimentais

Para o ensaio de citotoxicidade, foram utilizados três cimentos endodônticos: **Grupo AHP:** AH Plus Dentsply®; **Grupo MTA-R:** MTA reparador Angelus®; **Grupo MTA-O:** MTA obturador Angelus® (Quadro 1). O controle utilizado correspondeu à curva padrão de crescimento e viabilidade celular.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais de acordo com os cimentos endodônticos utilizados

Grupo Experimental	Agente de condicionamento do meio	Composição	Procedência
AHP	AH Plus (cimento obturador)	Pasta A: Resina epóxica bisfenol-A e bisfenol-F, tungstato de cálcio, sílica, óxido de zircônio, óxido de ferro Pasta B: óleo de silicone, amino adamantano, TCD-diamina, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, dibenzil-diamina	Dentsply®, Tulsa, EUA
MTA-R	MTA (cimento reparador)	SiO <sub>2</sub> , K <sub>2</sub> O, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> O, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , CaO, Bi <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MgO	Angelus®, Londrina, Brasil
MTA-O	MTA Fillapex (cimento obturador)	Resina diluente, resina natural, resina salicilato, óxido de bismuto, sílica nanoparticulada, MTA e pigmentos	Angelus®, Londrina, Brasil

Os extratos originais foram preparados seguindo as recomendações da ISO 10993. Para isto, os materiais foram manipulados, sobre placas de vidro, de acordo com as instruções do fabricante, sob condições assépticas, em capela de fluxo, para prevenir o risco de contaminação durante o teste de citotoxicidade. Posteriormente os cimentos foram inseridos em poços de placas contendo 24 poços (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Foram colocados 0,22 mL dos cimentos MTA-O e do AHP em cada poço, utilizando uma seringa de insulina de 1 mL. A quantidade de MTA-R colocada em cada poço foi de 1 g (conteúdo de um sachê) para 1 gota de água destilada. Essas proporções dos cimentos determinaram volumes iguais para os três tipos de cimentos testados (Figura 5).

Depois de manipulados, os cimentos foram deixados em estufa (5% CO<sub>2</sub> a 37°C) (Thermo Fisher Scientific Inc, United States) por 12, 48 e 72 h, de acordo com os tempos de endurecimento pré-estabelecidos para cada grupo.



Figura 5 – Volumes iguais dos cimentos testados alocados em poços da placa de 24 poços.

#### 4.5 Condicionamento do meio de cultivo

Transcorridos os períodos após a espatulação dos materiais, cada poço contendo os cimentos, foi preenchido com 2,5 mL do meio de cultura (DMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), com penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Após a colocação de meio, as placas permaneceram em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h. Posteriormente, o meio foi removido com auxílio de micropipetas do contato com os cimentos, formando os extratos originais (1:1) de cada material (Figura 6).

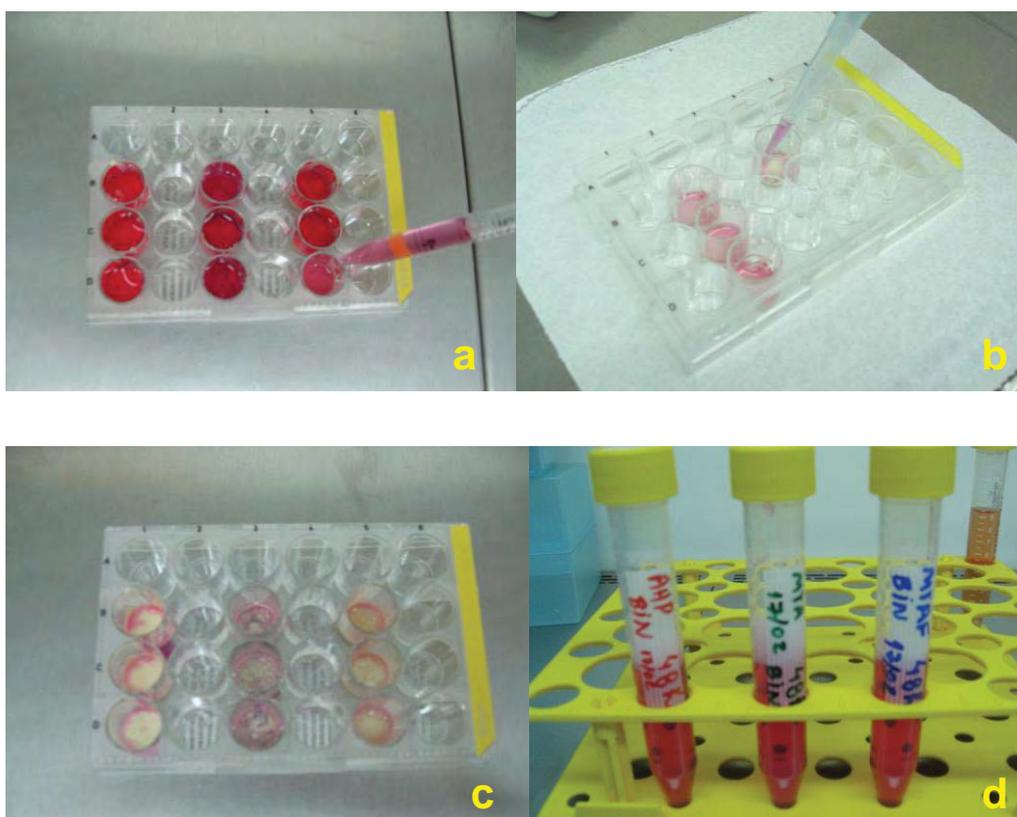


Figura 6 – a) preenchimento dos poços contendo os cimentos com 2,5 mL de meio; b) remoção do meio em contato com os cimentos com auxílio de micropipetas; c) placa após a remoção do meio; d) extratos originais (1:1) de cada cimento.

#### 4.5.1 Diluições

Para o teste de citotoxicidade, foram realizadas cinco diluições seriadas a partir do extrato original (1:1) até a obtenção da diluição 1:32. Para isso cinco tubos Falcon foram previamente preenchidos com 2,5 mL de meio de cultura cada um. Posteriormente, foram retirados 2,5 mL do extrato 1:1 e colocados no tubo seguinte contendo a mesma quantidade de meio formando assim a diluição 1:2. Essa mistura foi então agitada em vórtex (Biomixer Corp, Hawthorne, Califórnia) (Figura 7a) para que ocorresse a homogeneização. Posteriormente 2,5 mL dessa diluição foi retirada e despejada no tubo seguinte, formando a diluição 1:4. Esse experimento foi repetido sucessivamente até atingir a diluição 1:32 de cada cimento (Figura 7b).

Em seguida, 200  $\mu$ L dessas diluições (meios condicionados) foram colocados por poço em contato com os fibroblastos (V79) anteriormente plaqueados (Figura 7c) e as placas foram novamente levadas à estufa por 24 h.

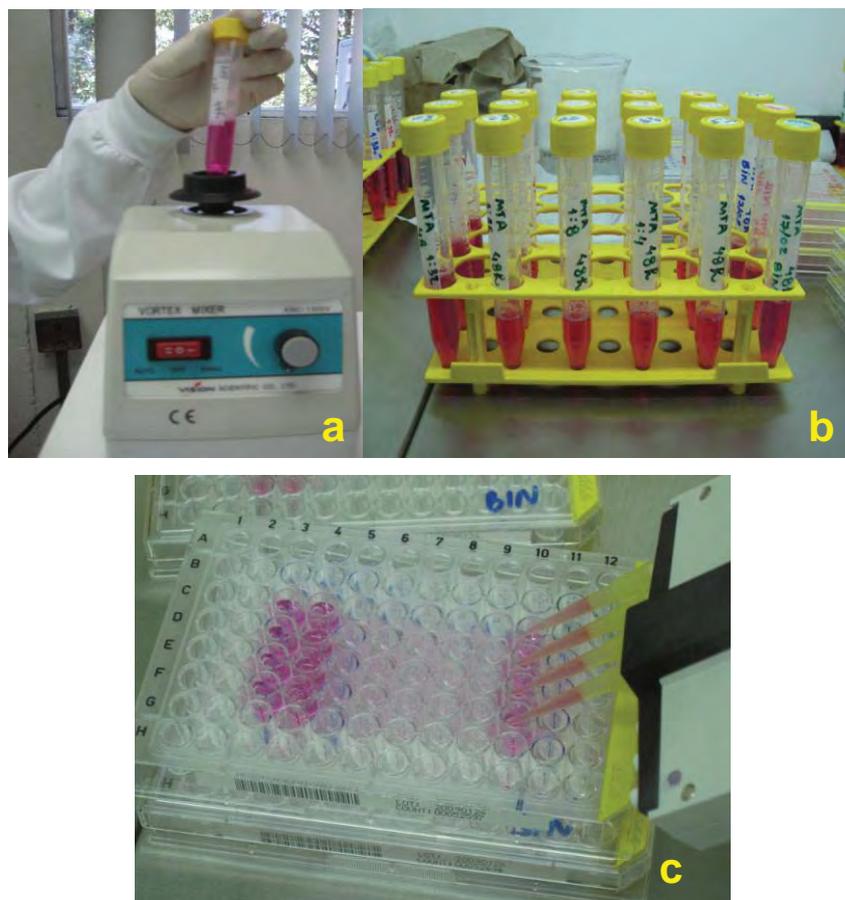


Figura 7 – a) diluição agitada em vórtex até homogeneização; b) tubos Falcon com as diluições obtidas a partir do extrato original (1:1); c) 200  $\mu$ L das diluições colocados por poço em contato com os fibroblastos (V79).

#### 4.6 Avaliação da viabilidade e crescimento celular

A avaliação da viabilidade e do crescimento celular foi realizada através da coloração pelo brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT), que é reduzido pelas células vivas, adquirindo coloração azul. De acordo com estudos anteriores, a

porcentagem de viabilidade celular considerada ideal para ensaios de citotoxicidade corresponde aos valores médios iguais ou acima de 50% .

Este ensaio baseia-se na quantificação do dano induzido pela substância testada no metabolismo celular de glicídios, pela mensuração da atividade mitocondrial, usualmente através da atividade de desidrogenases. 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., Germany) em 1 mL de solução de PBS (Figura 8a). Como essa solução é sensível a luz, foi mantida protegida com papel alumínio (Figura 8b). O meio de cultivo foi removido das placas e 100  $\mu$ L da solução de MTT foram adicionados em cada poço (Figura 8c). Cada placa foi envolvida em papel alumínio e colocada em estufa por uma hora. Após este período, o MTT foi removido, virando bruscamente as placas para baixo, a fim de despejar todo conteúdo dos poços. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich Co., Germany) (Figura 8d) em cada poço, e as placas foram novamente colocadas em estufa por 10 minutos.

Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado manualmente por 10 min e as placas foram levadas à leitora (Asys Hitech GmbH, Áustria) (Figura 8e e 8f) previamente programada. A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

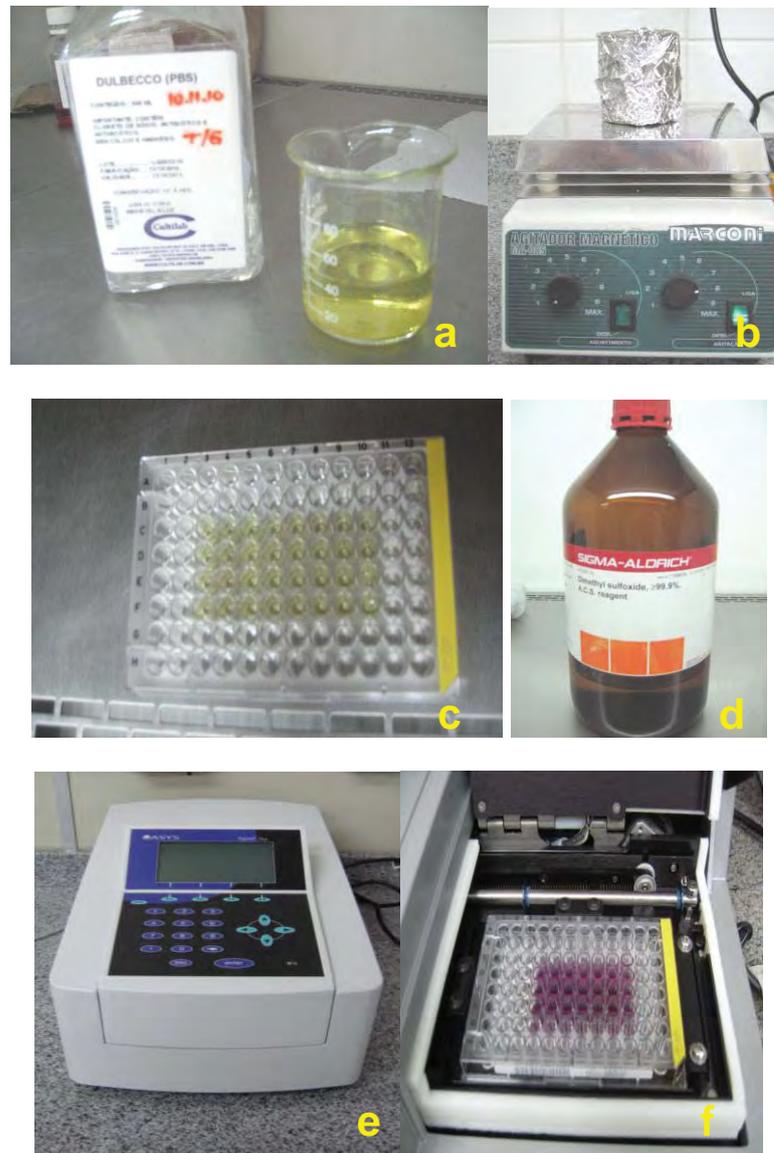


Figura 8 – Ensaio de MTT: a) Becker contendo MTT diluído em PBS; b) solução de MTT protegida da luz com papel alumínio; c) MTT em contato com as células nas placas de 96 poços; d) solução de DMSO; e) leitora de microplacas (espectrofotômetro); f) placa contendo as células, no interior da leitora.

#### 4.7 Ensaio de Micronúcleos (MNT)

O número de micronúcleos foi contado nas culturas celulares expostas às diluições dos cimentos MTA-O e AHP, as quais causaram excessivos efeitos citotóxicos sobre as células V79. Para tanto, foram selecionadas as diluições de cada material que se apresentaram mais citotóxicas. Além disto, para permitir avaliar os efeitos genotóxicos, também foram consideradas as diluições que não se apresentaram citotóxicas (viabilidade celular igual ou superior a 50%) de cada material. Uma vez que, as diluições excessivamente citotóxicas não permitiram a proliferação celular, impossibilitando a análise de genotoxicidade pela formação de micronúcleos.

Os fibroblastos (V79) foram cultivados em meio previamente preparado e constituído de meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O cultivo das células foi realizado em placas individuais (Nunc, Rochester, NY, EUA), e base de cada placa era constituída por uma lâmina de vidro (Figura 9a). Em cada placa foi testada uma única diluição.

No interior da placa, sobre a lâmina de vidro, foram semeadas uma quantidade de  $3 \times 10^5$  células em 4 mL de meio preparado por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio foi aspirado e as células foram expostas a 4 mL das diluições dos extratos testados e a 4 mL de etilmetano sulfonato 5 mM (EMS) (Sigma Aldrich Co., Germany) por 24 h em estufa (Figura 9b). O EMS foi utilizado no teste de micronúcleos, como controle positivo, por ser um material

comprovadamente genotóxico que causa grande indução de micronúcleos sobre as células V79 (Schweikl e Schmalz, 2000).

Posteriormente as placas foram retiradas da estufa e lavadas, individualmente, com 5 mL de PBS, que foi aspirado imediatamente. Em seguida, as células foram fixadas em 4 mL de etanol 100% (Ecibra Ind. Com. Ltda, São Paulo) por 30 min. O etanol foi aspirado e as lâminas de vidro, contendo as células fixadas, foram destacadas das placas e colocadas em suporte (berço) para o processo de coloração.

As lâminas foram imersas em 5N HCl (ácido clorídrico) (Dinâmica Ind. Com. Ltda, São Paulo) por 40 min, lavadas com água destilada e coradas com reagente Schiff (Sigma Aldrich Co., Germany) por 30 min em temperatura ambiente. Após lavagem em água sulfurada (Sigma Aldrich Co., Germany) por 6 minutos e em água corrente por 5 min, as células foram fixadas (álcool 70% por 5 min, álcool 80% por 5 min, álcool 90% por 5 min, álcool 96% por 5 min, álcool 100% por 10 min e xylol por 10 min). Finalmente as lamínulas foram coladas sobre as lâminas de vidro com Entellan (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha) e aguardou-se 24 h para o início das leituras em microscópio.

Os micronúcleos foram observados em microscópio de luz invertida (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça), sob lente de imersão (100X). Foram avaliadas 1000 células por lâmina por concentração em dois experimentos independentes.

Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e cujo tamanho correspondesse a uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal (Figura 9d).

Somente as células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose ou que exibiam fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

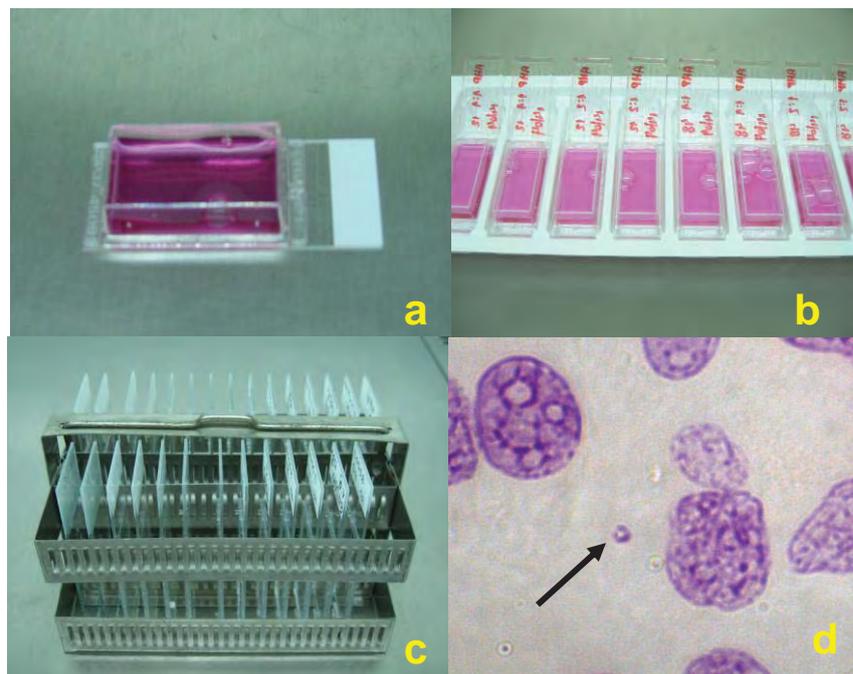


Figura 9 - a) cultivo celular na placa individual contendo uma lâmina de vidro para o ensaio de micronúcleo; b) células expostas às concentrações testadas por 24 h; c) lâminas de vidro alocadas em berço após fixação em álcool 100%; d) seta indicando micronúcleo.

#### 4.8 Análise Estatística

A análise estatística do ensaio de viabilidade celular e do teste de genotoxicidade em culturas de células, colocadas em contato com os meios condicionados em relação ao grupo controle foi avaliada através do teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn foi realizado para comparações dos pares entre grupos, com nível de significância de 0,05.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Teste de MTT**

#### **5.1.1 Estatística descritiva**

Os resultados obtidos a partir da leitura em espectrofotômetro correspondem indiretamente à atividade do metabolismo celular, pois representam a inibição da atividade da succinil desidrogenase, causada pelo contato entre as células e os cimentos nas diluições 1:1 (extrato original), 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. Os resultados presentes na Tabela 1 correspondem aos valores médios de viabilidade celular após a exposição aos extratos dos cimentos testados em cada diluição. Os valores estão expressos em porcentagem em relação às médias dos grupos controles (100%), de acordo com cada período de avaliação.

Tabela 1- Valores médios (% de células vivas) obtidos em três placas, após quatro leituras, para cada cimento e diluição

<b>Diluições</b>						
<b>Cimentos</b>	<b>1:1</b>	<b>1:2</b>	<b>1:4</b>	<b>1:8</b>	<b>1:16</b>	<b>1:32</b>
AHP 12 h	2,032	46,322	71,803	77,955	77,935	80,973
AHP 48 h	1,788	2,299	12,856	94,113	90,955	89,256
AHP 72 h	1,008	15,857	89,950	93,538	96,242	101,244
MTA-R 12 h	77,680	81,443	84,821	93,822	99,102	118,538
MTA-R 48 h	101,156	102,343	106,293	123,124	115,071	159,817
MTA-R 72 h	101,350	99,393	93,340	91,089	87,052	92,680
MTA-O 12 h	3,673	5,251	5,942	25,877	60,647	76,833
MTA-O 48 h	1,530	22,857	49,172	66,426	66,473	63,274
MTA-O 72 h	1,734	1,817	37,091	76,606	67,102	88,855

**MTA-R**=MTA reparador; **MTA-O**=MTA Fillapex; **AHP**=AH Plus.

Através dos valores representados na tabela acima, foi possível observar que o MTA-R manteve os índices de viabilidade celular acima de 50% para todas as diluições, conseqüentemente, não pôde ser classificado como um material citotóxico. Porém o MTA-O foi severamente citotóxico nas diluições mais concentradas (1:1, 1:2 e 1:4), assim como o AHP nas mesmas diluições (exceto 1:4 período de 72 h).

As figuras 10, 11 e 12 ilustram estes resultados e a Tabela 2 ilustra os valores médios, desvio padrão e mediana da porcentagem de viabilidade celular nas diferentes diluições, sem considerar o tempo de análise.

Tabela 2 - Valores médios, desvio padrão e mediana da porcentagem de viabilidade celular nas diferentes diluições, sem considerar o tempo de análise

Cimentos		Diluições					
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
AHP	MD	1,610	21,49	58,20	88,54	88,38	90,49
	DP	1,319	19,44	34,02	14,79	16,21	22,21
	MN	1,015	13,64	71,46	83,44	80,78	84,59
MTA-R	MD	93,40	94,39	94,82	102,68	100,41	123,68
	DP	20,43	18,87	21,78	24,79	20,78	41,62
	MN	95,94	96,26	97,10	104,52	99,85	104,31
MTA-O	MD	2,313	9,98	30,73	56,3	64,74	76,32
	DP	1,791	10,85	20,93	30,97	20,44	26,61
	MN	1,875	4,13	33,42	51,60	61,77	76,11

MD= média; DP= desvio padrão; MN=mediana.

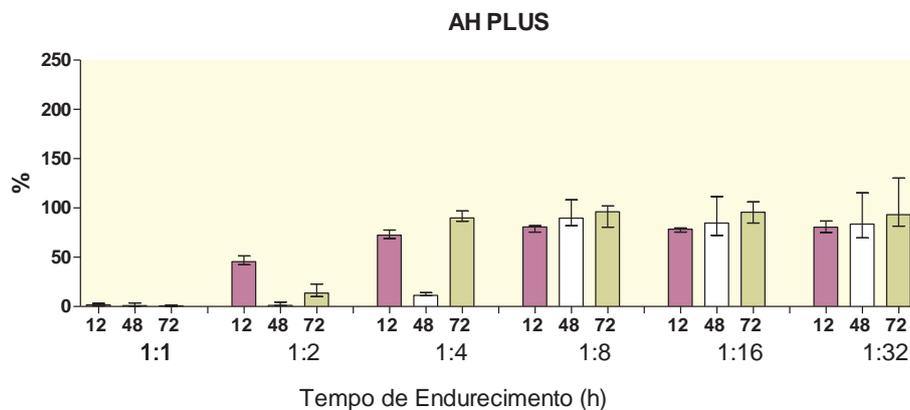


Figura 10 - Representação gráfica de colunas (média  $\pm$  desvio padrão) dos valores de viabilidade (%) no grupo AHP, segundo o tipo de diluição e tempo de endurecimento.

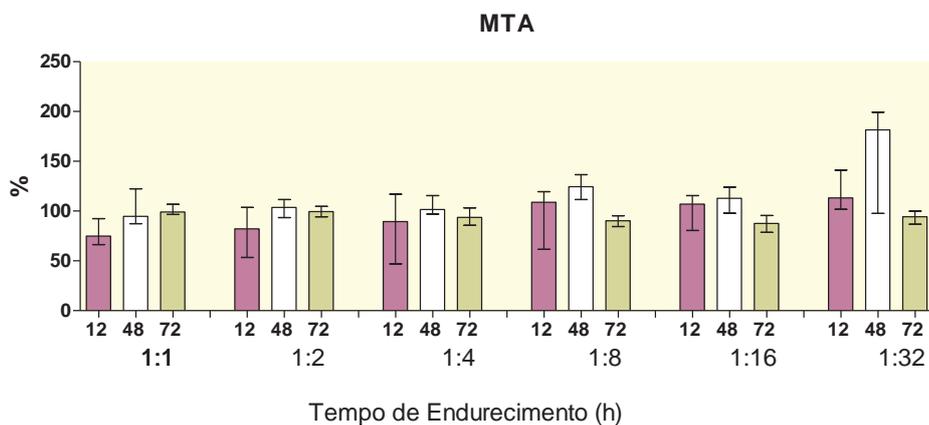


Figura 11 - Representação gráfica de colunas (média  $\pm$  desvio padrão) dos valores de viabilidade (%) no grupo MTA-R, segundo o tipo de diluição e tempo de endurecimento.

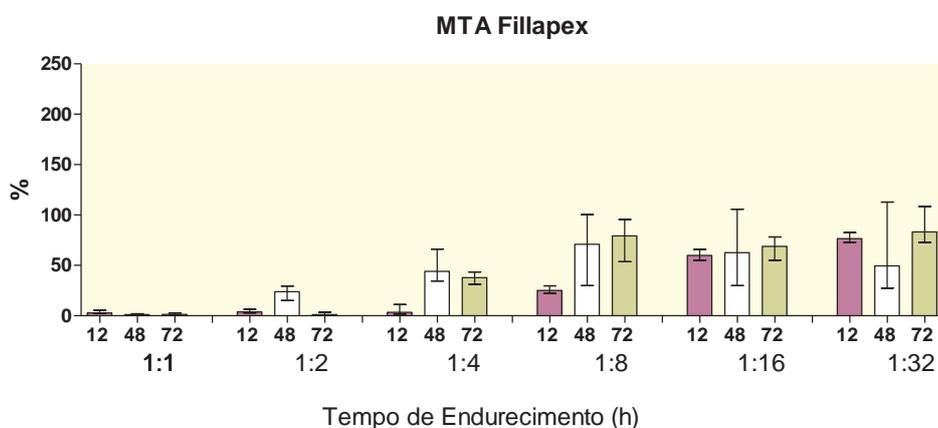


Figura 12 - Representação gráfica de colunas (média  $\pm$  desvio padrão) dos valores de viabilidade (%) no grupo MTA-O, segundo o tipo de diluição e tempo de endurecimento.

## 5.1.2 Estatística Inferencial

### Teste de Kruskal-Wallis

Ao realizar o teste de Kruskal-Wallis para a avaliação da viabilidade celular dos grupos experimentais em relação ao grupo controle, verificou-se haver diferenças dentre os grupos experimentais e o controle ( $p=0,00001$ ). Analisando os cimentos nas diferentes diluições verificou-se que existem diferenças, em relação ao grupo controle (100%), nos grupos MTA-R e MTA-O na diluição 1:1 ( $p=0,0040$  e  $0,0149$ , respectivamente); AHP e MTA-O na diluição 1:2 ( $p=0,00001$  e  $0,00001$ , respectivamente); na diluição 1:4 para os cimentos AHP e MTA-O ( $p=0,00001$  para os dois cimentos); na diluição 1:8 para os três cimentos ( $p=0,0188$ ;  $p=0,0006$  e  $p=0,001$ , respectivamente); na diluição 1:16, para os cimentos AHP e MTA-R ( $p=0,0153$  e  $p=0,0026$ , respectivamente); na diluição 1:32 para o cimento MTA-R ( $p=0,0028$ ).

Ao aplicar o teste de Dunn para verificar quais fatores dentro de cada variável apresentavam diferenças entre si, obteve-se as Tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Teste de Dunn para a variável cimento de acordo com as diluições

<b>Diluição</b>	<b>Cimentos</b>	<b>Grupos homogêneos</b>
<b>1:1</b>	AHP	B
	MTA-R	A
	MTA-O	B
<b>1:2</b>	AHP	B
	MTA-R	A
	MTA-O	B
<b>1:4</b>	AHP	B
	MTA-R	A
	MTA-O	C
<b>1:8</b>	AHP	B
	MTA-R	A
	MTA-O	C
<b>1:16</b>	AHP	A
	MTA-R	A
	MTA-O	B
<b>1:32</b>	AHP	B
	MTA-R	A
	MTA-O	B

Tabela 4- Teste de Dunn para os grupos, diluições e tempos que apresentaram diferenças

<b>Cimentos</b>	<b>Diluições</b>	<b>Tempo</b>	<b>Grupos Homogêneos</b>
<b>AHP</b>	1:2	12 h	A
		48 h	C
		72 h	B
	1:4	12 h	B
48 h		C	
1:8	12 h	A	
	48 h	A	
	72 h	A	
1:16	12 h	B	
	48 h	A B	
	72 h	A	
<b>MTA-R</b>	1:1	12 h	B
		48 h	A B
		72 h	A
	1:8	12 h	B
48 h		A	
1:16	12 h	B	
	48 h	A B	
	72 h	A	
1:32	12 h	B	
	48 h	A B	
	72 h	A	
	72 h	B	
<b>MTA-O</b>	1:1	12 h	A
		48 h	B
		72 h	A B
	1:2	12 h	B
48 h		A	
1:4	12 h	B	
	48 h	A	
	72 h	A	
1:8	12 h	B	
	48 h	A	
	72 h	A	

Ao comparar a variável tempo para cada diluição dos cimentos analisados pôde-se observar que não houve uma homogeneidade entre os resultados obtidos, impedindo uma correlação

relevante entre as diluições. Porém, através dos dados obtidos, o MTA-R parece desempenhar melhor ação no período de 48 h após o seu endurecimento. Já o MTA-O obteve índices inferiores de viabilidade após 12 h de sua manipulação (diluições 1:2; 1:4 e 1:8) e o AHP foi mais citotóxico, principalmente, no período de 48 h (evidenciado nas diluições 1:2 e 1:4).

## 5.2 Teste de micronúcleos (MNT)

A formação de micronúcleos pelos materiais endodônticos testados foi analisada em cultura de células V79. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA presentes no citoplasma, claramente separadas do núcleo principal e compreendendo menos de 1/3 da área nuclear. Apenas células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contadas; células em mitose ou exibindo fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas.

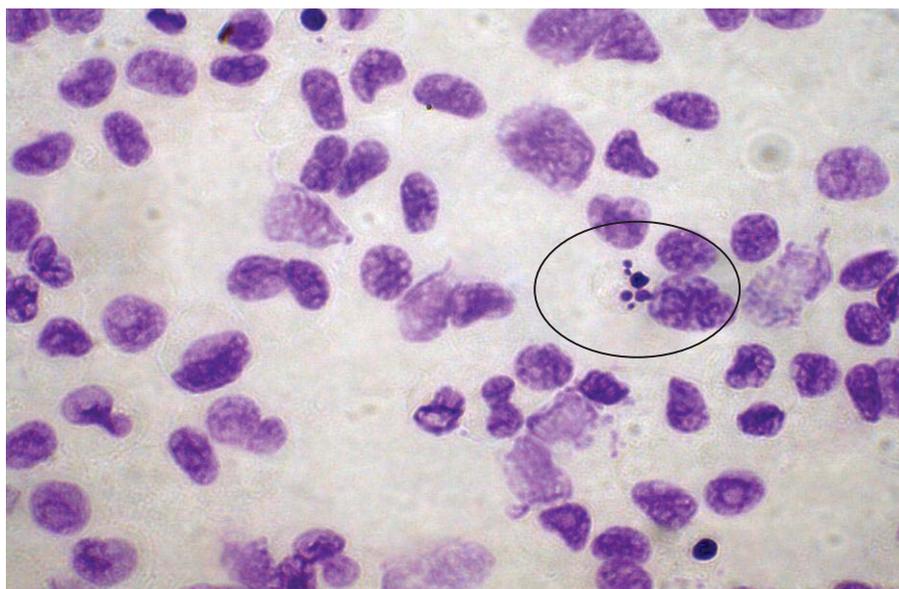


Figura 13 – Célula exibindo seis micronúcleos

Além das diluições consideradas citotóxicas pelo teste de MTT (viabilidade celular abaixo de 50%) representadas na Tabela 5, as diluições não citotóxicas 1:4 (12 e 72 h); 1:8 e 1:16 do AHP; 1:1 (12 h) do MTA-R, 1:8 (48 e 72 h) e 1:16 do MTA-O também foram submetidas ao teste de micronúcleo como padrão de comparação e avaliação dos efeitos genotóxicos. As diluições mais concentradas (1:1 e 1:2) dos grupos AHP e do MTA-O foram excessivamente citotóxicas a ponto de não permitirem a proliferação celular ou por causarem morte celular significativa, impedindo a leitura das lâminas mais citotóxicas (Figura 14a e 14b). Culturas de células V79 não expostas aos cimentos foram utilizadas como controle negativo.

Tabela 5- Diluições dos grupos experimentais consideradas citotóxicas

<b>Grupos</b>	<b>Diluições</b>	<b>Tempos (h)</b>
<b>AHP</b>	1:1	12 48 72
	1:2	12 48 72
	1:4	48
<b>MTA-O</b>	1:1	12 48 72
	1:2	12 48 72
	1:4	12 48 72
	1:8	12

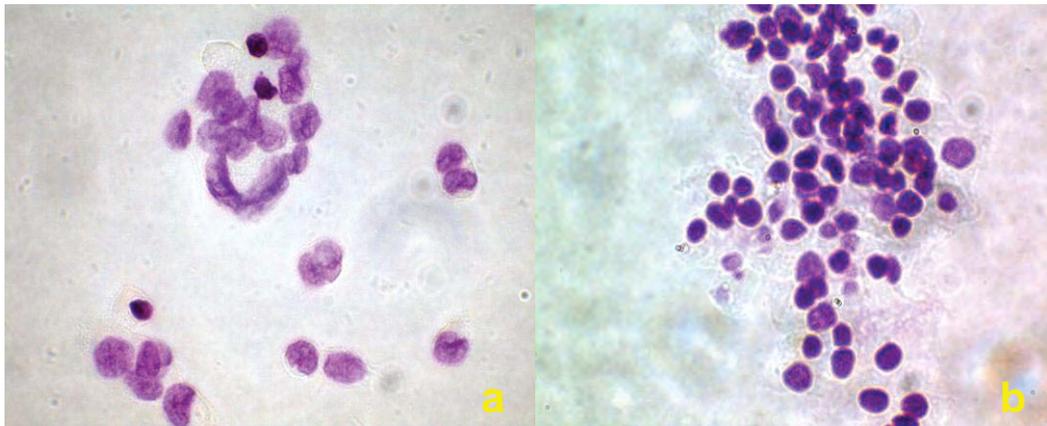


Figura 14 – a) diluição 1:1 do AHP 12 h: presença de poucas células; b) diluição 1:1 do MTA-O 72 h: células apoptóticas com formato arredondado e cromatina condensada.

Os extratos dos cimentos AHP e MTA-O aumentaram o número de micronúcleos nas culturas de células V79 em comparação ao controle negativo. Contudo, as diluições 1:4 do AHP (48 h) e 1:4 do MTA-O (48 h) foram as mais genotóxicas dos materiais gerando uma formação de micronúcleos 8 vezes maior que do controle negativo e semelhante ao EMS. Já, na diluição 1:8 e 1:16 do AHP (48 h) o aumento foi similar ao controle (Tabela 6 e Figura 16).

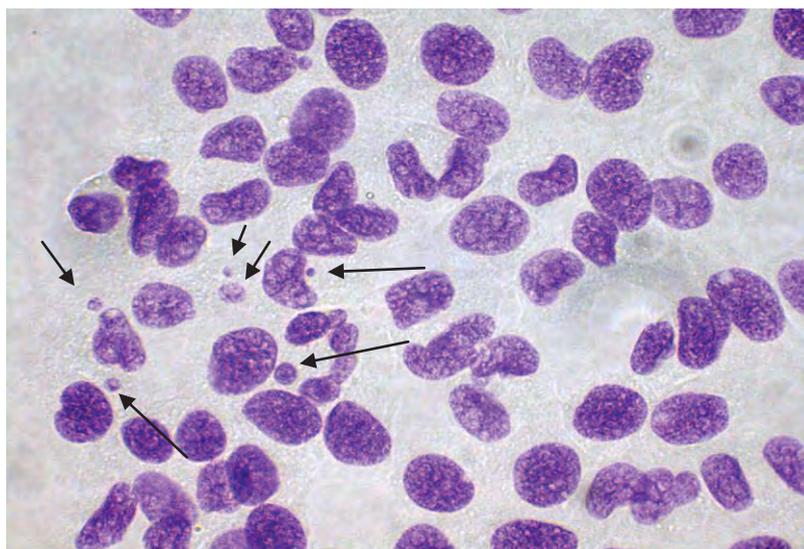


Figura 15- Diluição 1:4 do MTA-O no período de 48 h, as setas mostram a presença de micronúcleos.

Tabela 6 - Formação de micronúcleos pelo contato das células V79 com os extratos dos materiais, expressos em micronúcleos por 1000 células, indicando os valores de mediana e os percentuais 25% e 75%

<b>Materiais</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Controle (-)</b>	8,500	7,000	10,00
<b>AHP 1:8 (12 h)</b>	10,00	9,000	11,00
<b>AHP 1:4 (48 h)</b>	68,00	60,00	76,00
<b>AHP 1:16 (12h)</b>	10,00	9,000	11,00
<b>AHP 1:16 (48 h)</b>	7,000	6,000	8,000
<b>AHP 1:8 (48 h)</b>	8,500	8,000	9,000
<b>MTA-O 1:4 (72 h)</b>	5,000	5,000	5,000
<b>MTA-O 1:4 (48 h)</b>	68,00	65,00	71,00
<b>MTA-O 1:8 (12h)</b>	9,000	7,000	11,00
<b>MTA-R 1:1 (12 h)</b>	14,00	11,00	17,00
<b>EMS</b>	91,00	84,00	98,00

\* (-) =controle negativo.

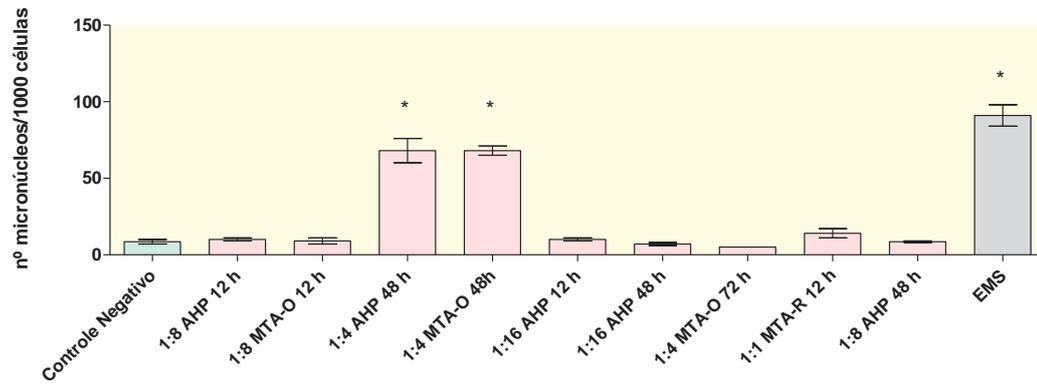


Figura 16- Indução de micronúcleos em células V79 após a exposição às diluições dos extratos dos cimentos testados. Gráfico de colunas representando a mediana do número de micronúcleos em relação ao controle negativo. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle negativo e os grupos tratados são indicadas com asteriscos.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Discussão da metodologia**

O cimento reparador à base de MTA é um material amplamente utilizado na endodontia, por ser considerado indutor ou estimulador da mineralização (Holland et al., 1999). Possui aplicação diversificada, podendo ser utilizado na proteção do complexo dentino/pulpar, em casos de proteção pulpar direta e indireta, apicificação, perfurações radiculares ou de furcas ou ainda ser aplicado em cirurgias pararendodônticas, sendo que neste caso pode ser usado como preenchedor de defeitos ósseos ou como material retrobturador de canais radiculares (Hayashi et al., 2004; Torabinejad et al., 2010). Recentemente, foi lançado o cimento obturador à base de MTA (MTA Fillapex, Angelus®), com a finalidade de ser utilizado na obturação de canais radiculares. No entanto, ao analisarmos a composição química deste novo material, fornecida pelo próprio fabricante, é válido ressaltarmos que se trata de um cimento resinoso que contém MTA em sua composição, e, por ser um produto recente, ainda, não foram verificados estudos relacionados com este novo cimento. Porém, esperava-se que por ser MTA, este cimento obtivesse propriedades similares ao reparador.

Uma vez que o MTA pode ser aplicado tanto sobre os tecidos periodontal e pulpar, é importante conhecer seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, haja vista, que alguns cimentos endodônticos podem liberar componentes tóxicos aos tecidos vivos, prejudicando o

processo de regeneração ou reparação dos tecidos no qual entram em contato (Schwarze et al., 2002).

Contudo, o grande desafio no estudo dos cimentos endodônticos é encontrar um material que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor, uma vez que a biocompatibilidade é requisito mínimo para a colocação de materiais em contato com os tecidos biológicos (Schweikl, Schmalz, 2000). Um cimento biocompatível além de promover a reparação tecidual, deve, preferencialmente, também estimular a reorganização das estruturas lesionadas. Assim, o estudo da citotoxicidade faz-se necessário para a seleção de um melhor cimento endodôntico que apresente maior potencial para induzir a reparação do tecido pulpar e periapical (Schwarze et al., 2002; Schmalz, 2004).

Entre as várias metodologias recomendadas para a avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos, os testes *in vitro* em cultura de células têm sido muito utilizados (Schwarze et al., 2002; De Deus et al., 2005; Takita et al., 2006).

Para análise da viabilidade ou sobrevivência celular frente aos cimentos obturadores, os testes de citotoxicidade *in vitro* são relevantes na caracterização das propriedades biológicas básicas desses cimentos. Trata-se de um método de menor custo e de maior reprodutibilidade quando comparado a um teste executado em animais (Koulaouzidou et al., 1998; Schmalz, 2004; Ribeiro et al., 2006).

A avaliação da citotoxicidade por meio da análise colorimétrica do Metiltetrazolium (teste do MTT) é uma técnica confiável, rápida e facilmente reproduzível. Reflete não somente o número de células de uma amostra, mas também o nível de sua atividade metabólica, porque é baseado na atividade de enzimas, como a succinil desidrogenase, presente em mitocôndrias de células viáveis. Além disto, a partir dos resultados obtidos no teste de citotoxicidade é possível

realizar outros testes para avaliar o uso desses cimentos em humanos com maior segurança (Schmalz 2004).

Apesar de existirem muitos estudos na literatura que avaliam a citotoxicidade dos cimentos obturadores, verifica-se que ainda existem poucos trabalhos que analisam os danos que estes materiais podem causar ao DNA celular como um fator importante de influência na biocompatibilidade. Efeitos nocivos ao genoma celular podem reduzir a capacidade de auto-reparação tecidual, ou ainda podem propiciar o desenvolvimento de neoplasias (Ribeiro et al., 2004, 2006).

Para avaliar o dano ao DNA empregam-se os testes de genotoxicidade *in vitro* que detectam materiais ou componentes capazes de induzir danos ao material genético das células, além de possuírem ampla aceitação como um importante indicador carcinogênico (Ribeiro et al., 2006; Brendler-Schwaab et al., 2006). Porém testes *in vitro* têm a desvantagem de não considerarem a resposta imunológica do organismo quando da exposição a esses cimentos ou frente a outros materiais tóxicos (Schwikel et al., 2006). Dentre os testes de genotoxicidade *in vitro* destaca-se o teste de micronúcleo (MNT) que é utilizado para detecção de mutações cromossômicas durante a mitose no processo de divisão celular (Ribeiro et al., 2008).

Estudos baseados em ensaios de citotoxicidade somado a experimentos de genotoxicidade implicarão em maiores conhecimentos quanto à biocompatibilidade dos cimentos utilizados na endodontia. Por tratar-se de um experimento *in vitro*, tem como vantagem, maior facilidade no controle dos fatores experimentais envolvidos que são freqüentemente causas de problemas em experimentos *in vivo*. Assim, a partir dos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade será possível avaliar a segurança do uso destes cimentos na endodontia.

Nesta pesquisa, células V79, que apresentam fenótipo de fibroblastos de hamster Chinês, foram utilizadas, pois são consideradas células estáveis, dotadas de boa reprodutibilidade, além de possuírem

morfologia homogênea e que têm sido amplamente utilizadas em pesquisas laboratoriais, inclusive em testes de citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos endodônticos (Camargo et al., 2009). O contato de materiais obturadores com esse grupo celular promove sua alteração morfológica, mudanças no metabolismo, variações no processo de síntese do colágeno, ativação do processo de mitose, aceleração da apoptose, além da liberação de citocinas e fatores de crescimento (Ribeiro et al., 2006). Assim, o emprego dessas células em estudos que avaliam alterações genéticas e citotóxicas fornece informações compatíveis com o comportamento biológico das células frente aos materiais em humanos (Ribeiro et al., 2006).

Neste trabalho tanto a citotoxicidade como a genotoxicidade foram realizadas em diferentes tempos de endurecimento dos cimentos (12, 48 e 72 h), a fim de permitir uma avaliação precoce e tardia dos efeitos cito e genotóxicos dos cimentos em relação ao tempo de presa dos mesmos. Essa análise permite avaliar tanto uma resposta precoce (12 h após a manipulação dos cimentos) quanto uma resposta tardia (48 e 72 h após a manipulação). Uma vez que, a viabilidade celular no tempo de 12 h pode ser influenciada pelo fato do material ainda estar nos períodos iniciais pós-endurecimento e desta forma, é provável que componentes tóxicos que são liberados durante a reação de endurecimento sejam os responsáveis pela citotoxicidade destes materiais. É também possível, que mesmo após a presa do material (48 e 72 h) os cimentos testados ainda sejam capazes de liberar componentes tóxicos, o que levou-nos a avaliar estes diferentes períodos após a manipulação dos materiais.

## 6.2 Discussão dos resultados

### 6.2.1 Ensaio de citotoxicidade

Sabe-se que com a aplicação clínica das diferentes formulações de MTA ocorre o contato direto do cimento com o tecido conjuntivo, principalmente com as células e vasos sanguíneos, presentes no ligamento periodontal, tecido ósseo e pulpar. Devido a essa interação entre os cimentos e os tecidos, existe a necessidade de obter-se maior conhecimento sobre os efeitos citotóxicos e propriedades biológicas dos materiais endodônticos (Ribeiro et al., 2006).

Com esse propósito, pesquisas desenvolvidas nos últimos anos têm demonstrado que o MTA convencional (reparador) apresenta baixo efeito citotóxico, determinando resultados favoráveis quando comparado a outros materiais considerados biocompatíveis usados para a mesma finalidade (Costa et al., 2003; Bonson et al., 2004; Ribeiro et al., 2006., Camargo et al., 2009).

Neste estudo, o MTA reparador (MTA-R) e o MTA obturador (MTA Fillapex), foram avaliados pelo teste de citotoxicidade de MTT que determina o número de células viáveis em função da atividade mitocondrial das mesmas. Os resultados mostraram que o MTA-R não foi citotóxico, pois manteve acima de 50% a viabilidade celular para todas as diluições testadas, estes resultados estão condizentes com os de trabalhos anteriores (Watanabe et al., 2008; Camargo et al., 2009; Chen et al., 2010). A baixa citotoxicidade e a biocompatibilidade deste cimento tem sido atribuída aos principais componentes presentes no MTA-R, que também são os principais componentes do tecido dentinário, ou seja o silicato de tricálcio, óxido de cálcio, óxido de silicato e aluminato de

tricálcio, sendo esta composição a responsável pelos bons resultados biológicos deste material (Olsson et al., 1981).

O MTA-R foi estatisticamente diferente dos demais cimentos nas diluições 1:1; 1:2 e 1:32. Nas diluições 1:4 e 1:8 todos os cimentos foram estatisticamente diferentes entre si. Porém na diluição seguinte (1:16) o MTA-O foi estatisticamente inferior aos outros materiais. Em relação aos resultados que compararam os tempos de presa dos cimentos testados (12, 48 e 72 h), não houve uma homogeneidade desses resultados, impedindo uma correlação relevante entre as diluições. Porém, através dos dados obtidos, o MTA-R parece desempenhar melhor ação durante o período de 48 h. Período este, em que as células V79 atingiram os maiores valores de viabilidade celular.

Balto et al., 2004, verificaram que fibroblastos do ligamento periodontal humano, quando em contato com outro cimento de MTA recém-manipulado (Pro-Root MTA, Dentsply, Tulsa EUA), apresentaram morfologia diferente das células sem contato com o cimento (controle negativo) e das células em contato com a solução de metilmetacrilato na concentração de 2%, utilizada como controle de citotoxicidade. No controle positivo, a superfície das células apresentava muitos vacúolos e algumas bolhas, características comuns de células injuriadas que estariam em processo de morte. Os fibroblastos colocados em contato com o cimento Pro-Root MTA, sem presa completa, apresentavam morfologia variada, com poucas células aderidas à superfície do cimento. Por outro lado, quando estes fibroblastos foram colocados em contato direto com o cimento Pro-Root MTA com presa completa, a morfologia celular era mais homogênea, semelhante àquela observada para o grupo controle negativo. No presente estudo, não foram realizados testes morfológicos sobre as células V79, porém, para o ensaio de genotoxicidade, e, durante a leitura das lâminas, observou-se que os fibroblastos expostos ao MTA-R, exibiam morfologia semelhante às células do grupo controle (células em meio de cultura DMEM). Além disto,

os valores de viabilidade celular dos fibroblastos V79 expostos ao MTA-R foram altos, inclusive no período de 12 h (tempo mais próximo pós-manipulação).

Em estudo semelhante, também utilizando o cimento reparador de MTA (MTA-Branco Angelus), Aranha et al., 2006, demonstraram em MEV, que as células odontoblastóides MDPC-23 exibiam perfil ligeiramente alongado e com finos prolongamentos citoplasmáticos originados de seu corpo celular, semelhantes àqueles observados no grupo, no qual as células foram mantidas em contato com meio de cultura DMEM, embora Balto et al., 2004, tenham verificado que o tempo de presa não exerceu influência significativa na citotoxicidade do material. Diferenças na composição do cimento Pro-Root MTA avaliado por Balto et al., 2004, e no cimento MTA-Branco (Angelus) analisado por Aranha et al., 2006, podem ter determinado diferentes resultados com relação aos efeitos citotóxicos relacionados às condições de presa dos materiais. Sabe-se que o MTA-Branco apresenta menor concentração de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (0,15%) quando comparado ao Pro-Root MTA (2,5%) (Aranha et al., 2006), podendo assim determinar efeitos citotóxicos diferentes.

Ainda Balto et al., 2004, sugeriram que a maior citotoxicidade do MTA recém-manipulado tenha ocorrido devido à maior liberação em meio aquoso de componentes tóxicos do cimento, os quais teriam afetado a morfologia das células e sua capacidade de adesão. Assim, o pequeno efeito tóxico do cimento reparador de MTA sem presa completa, pode determinar mínimo efeito irritante do material mesmo quando utilizado como agente capeador direto, uma vez que esse cimento é aplicado sobre a polpa imediatamente após sua manipulação, ou seja, com presa incompleta.

Outro fator importante sobre a aplicação *in vivo* dos cimentos é que a liberação de alguns componentes dos materiais aplicados sobre o tecido conjuntivo pode resultar em benefícios para o processo de cura tecidual. Nesse contexto, foi demonstrado que o óxido

de cálcio presente na composição de vários cimentos à base de MTA pode reagir com fluídos tissulares para formar o hidróxido de cálcio. Pois, após implante do Pro-Root MTA no tecido subcutâneo dorsal de ratos, Holland et al., 1999; Yaltirik et al., 2004, observaram a presença de calcificação distrófica no tecido conjuntivo adjacente ao cimento, sugerindo o potencial de formação de tecido duro por esse material. Esses resultados são concordantes com os de outras pesquisas onde barreiras mineralizadas se formaram após capeamento da polpa dentária com MTA (Tziafas et al., 2002; Chacko et al., 2006).

FridLand e Rosado (2003) ao determinarem a composição do sal de MTA dissolvido na água, identificaram os íons cálcio e  $\text{OH}^-$  como os principais componentes liberados, sendo este último o responsável pela alta alcalinidade do MTA (pH 11,94-11,99). Porém, devido à característica límpida dos extratos obtidos do material experimental e de seu reduzido efeito citotóxico, pode-se sugerir que o cimento reparador de MTA apresenta, mesmo imediatamente após sua manipulação, baixa liberação desses componentes. Por isso, talvez a aplicação do MTA sobre polpas expostas possa causar mínimos danos iniciais ao tecido, o que resultaria em delgada camada de necrose da polpa imediatamente abaixo do material capeador, processo esse, que permitiria ou mesmo participaria diretamente do processo de reparo de feridas pulpares, num curto período de tempo sem ocorrer perda expressiva do tecido pulpar local. Fator este que proporcionaria manutenção da elevada capacidade de regeneração do tecido pulpar (Murray et al., 2000).

Pelo teste de citotoxicidade através do ensaio de difusão em ágar com o corante vermelho neutro Torabinejad et al., (1995) registrou uma zona de células em lise ao redor das amostras de MTA, tanto logo após sua manipulação quanto depois da presa do material. Saidon et al., 2003 e Haglung et al., 2003 encontraram ainda áreas de proteínas desnaturadas e de células mortas abaixo do MTA recém manipulado, além de células com alterações morfológicas e uma grande

quantidade de células viáveis presentes na maioria das placas (Koulaouzidou et al., 2005; Miranda et al., 2010). Esses achados são coerentes com a formação de uma camada de necrose tecidual localizada logo abaixo da presença do cimento reparador de MTA (Murray et al., 2000).

Apesar dos cimentos à base de MTA cinza e branco serem considerados pouco citotóxicos e exibirem efeitos similares sobre fibroblastos, durante a análise microscópica, estas células apresentaram comportamento mais favorável na presença do MTA cinza (Miranda et al., 2010). De acordo com Perez et al., 2003; Camilleri et al., 2004, um menor crescimento celular foi confirmado na presença do MTA branco, mesmo sendo comprovada sua biocompatibilidade. Porém, no estudo de Camargo et al., (2009) não houve diferenças estatisticamente significativas entre o MTA branco e o MTA cinza, apenas, este último promoveu uma discreta reação sobre as células pulpares, durante a exposição destas ao extrato original (1:1) e a diluição 1:2, em relação ao MTA branco.

Os valores de pH dos extratos do cimento de MTA-R variam entre 7 e 8,5 (Camargo et al., 2009). Após a manipulação do MTA, este sofre uma reação de hidratação que resulta na formação do hidróxido de cálcio e sua posterior dissociação iônica em íons  $\text{Ca}^{+2}$  e em hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ), responsável pelo aumento de pH e elevação da concentração de cálcio no meio (Santos et al., 2005). Quanto menor o pH do cimento, menor será a camada de necrose superficial formada quando este é colocado em contato com o tecido, no entanto, este pH sendo alcalino, ele induz a expressão da atividade da fosfatase alcalina pela população de fibroblastos teciduais, sendo associado ao processo de mineralização (Yaltirik et al., 2004).

Holland et al., (2002), sugere, que a formação de uma barreira de tecido duro é promovida através da liberação de íons cálcio nos tecidos adjacentes, uma vez que, estes estimulariam a deposição de

tecido mineralizado. O mecanismo seria iniciado pela liberação de íons cálcio advindos do MTA. Quando em contato com osteoblastos, o MTA parece oferecer um substrato biologicamente ativo para as células do osso, além de estimular a produção de interleucinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e de fator estimulador de macrófagos (Koh et al., 1998). Substâncias essas envolvidas no processo de recrutamento e maturação de osteoblastos, além da participação na formação óssea.

No presente estudo, o AH Plus foi o cimento de citotoxicidade intermediária e, em altas diluições (1:16 e 1:32) apresentou desempenho similar ao MTA-R em diluições mais concentradas (1:1 e 1:2) e similar ao MTA-O nos extratos menos diluídos (1:1 e 1:2). Este resultado está de acordo com estudos prévios (Miletic et al., 2005) onde também foi possível observar severa citotoxicidade para o AH Plus no período de 48 h de presa (diluições 1:2 e 1:4). Os autores observaram ainda que o AH Plus mostrou-se muito citotóxico imediatamente após a manipulação (0 h) e depois de 24 h e 48 h da presa. Entretanto, após 7 e 30 dias do endurecimento, não houve diminuição da proliferação celular quando expostas diretamente ao cimento. Igualmente, efeitos citotóxicos foram reportados para o AH 26 e AH Plus após 24 h do período de endurecimento (Huang et al., 2002). Por outro lado, Bouillaguet et al. (2006) e Pinna et al. (2008) observaram que a toxicidade aumentou com o tempo, após 72 h de exposição.

Contudo, o AH Plus foi o cimento mais citotóxico sobre diferentes linhagens celulares no estudo de Tai et al. (2002), e isso pode ser explicado devido ao AH Plus ainda apresentar em sua composição uma substância mutagênica, a resina epóxica, que também exibe perfil citotóxico, especialmente em concentrações pouco diluídas (Schweikl e Schmalz, 2000). Embora o fabricante do cimento à base de resina epóxica AH Plus alegar que este material não libera formaldeído, como seu precursor AH 26, sua citotoxicidade pode ser atribuída à liberação mínima desse componente pelas aminas adicionadas a sua composição para

acelerar a polimerização epóxica (Huang et al., 2002; Eldeniz et al., 2007). Os resultados do AH Plus também podem ser explicados pela variação nos tempos de endurecimento, que por sua vez é influenciada por fatores como a umidade e temperatura, bem como as condições de remoção dos espécimes.

Finalmente, o cimento mais citotóxico analisado neste estudo foi o MTA Fillapex, que reduziu severamente a sobrevivência celular mesmo quando estas foram expostas à diluição intermediária (1:4). Porém, pôde-se observar que este cimento obteve melhor comportamento no período de 48 h, mesmo nas concentrações menos diluídas 1:2 e 1:4, onde foi possível visualizar aumento do nível da viabilidade celular.

Os resultados referentes a este cimento são de difícil discussão devido à ausência de trabalhos de citotoxicidade que utilizam esse material, por se tratar de um produto recém lançado no mercado específico e ainda pouco difundido. Porém esses resultados sugerem que o comportamento citotóxico apresentado por este cimento pode ser resultado da liberação de componentes resinosos como a resina salicilato presente na sua composição. Pesquisas que avaliaram a citotoxicidade deste constituinte sobre linhagem celular de fibrossarcoma humano (HT-1080) utilizando o MTT demonstraram 25% de apoptose celular após 24 h de exposição ao salicilato. Ainda há trabalhos que verificam que no exame histológico as células apresentaram claros sinais de apoptose como arredondamento celular, encolhimento, presença de vacúolos e de fragmentos de material genético no citoplasma (Smith et al., 1990; Stark et al., 2001; Mahdi et al., 2006). O mecanismo pelo qual ocorre essa apoptose ainda não é claro, mas o estudo demonstrou que quanto maior a concentração de salicilato maior é o nível de morte celular (Mahdi et al., 2006). Esse dado é coerente com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que as diluições mais concentradas do MTA Fillapex causaram níveis acentuados de citotoxicidade e morte celular.

De acordo com os resultados desta pesquisa, a liberação desses constituintes resinosos deve ocorrer, principalmente, durante o período de 12 h após o endurecimento do cimento. Momento esse em que foram registradas as menores taxas de viabilidade celular (diluições 1:2; 1:4 e 1:8).

Diante dos severos níveis citotóxicos apresentados pelo cimento MTA Fillapex, é pertinente sugerirmos a alteração ou substituição dos componentes resinosos presentes em sua composição por outros constituintes mais biocompatíveis, a fim de minimizar o nível de morte celular e os danos citotóxicos induzidos por este material.

#### 6.2.2 Ensaio de genotoxicidade

A utilização de testes de genotoxicidade é essencial para a avaliação dos riscos que certos materiais tóxicos podem causar sobre o material genético humano, bem como para que esses riscos possam ser prevenidos (Ribeiro et al., 2008).

Neste estudo foi utilizado o teste de micronúcleos, que é baseado na perda de cromossomos ou de fragmentos de cromossomos durante a mitose celular, e estes não são reincorporados junto ao núcleo após a divisão celular e, conseqüentemente são transformados em pequenos núcleos ou micronúcleos.

O EMS foi utilizado, como controle positivo, por ser um material com alto potencial genotóxico. Uma vez que estimula intensamente a formação de micronúcleos nas células V79 (Schweikl e Schmalz, 2000; Schweikl et al., 2004, 2005; Demirci et al., 2008).

Neste estudo verificou-se que os cimentos AHP e MTA-O, foram citotóxicos sobre as células V79, entretanto observou-se que o MTA-R não foi citotóxico nas condições do experimento. Portanto, o teste

de genotoxicidade foi realizado apenas para o AHP e MTA-O, com o objetivo de analisar se estes cimentos seriam capazes de estimular a formação de micronúcleos. Para o MTA-R foi avaliado a genotoxicidade apenas em uma diluição como parâmetro durante a comparação entre os cimentos.

As diluições dos materiais experimentais (AHP - 1:4; 1:8 e 1:16, MTA-O - 1:8 e 1:16 e MTA-R – 1:1) foram escolhidas de acordo com os resultados prévios de um teste piloto, onde foi possível verificar que diluições menores, ou mais concentradas, provocaram morte celular acentuada das células V79, impossibilitando a contagem celular e do número de micronúcleos. Portanto todas as diluições do MTA-R não deveriam ser analisadas neste ensaio, devido às altas taxas de viabilidade celular alcançadas por este material em todas as diluições e períodos. Porém a diluição 1:1 (12 h) deste cimento também foi analisada com o objetivo de servir como padrão de comparação quanto à formação de micronúcleos em relação aos outros dois cimentos.

Neste estudo, o MTA-R foi o cimento testado que, proporcionalmente, menos induziu a formação de micronúcleos sobre as células V79. Pois mesmo na diluição 1:1 pouco estimulou a formação de micronúcleos (entre 11-17 micronúcleos), assemelhando-se ao grupo controle não-tratado, onde o número de micronúcleos foi reduzido (entre 7-10 micronúcleos).

Vários estudos comprovam a ausência de genotoxicidade para várias concentrações testadas desse material (1 até 1000 µg/mL), tanto para o cimento Portland (cinza e branco) quanto para o cimento ProRoot MTA (cinza e branco) (Ribeiro et al. 2006a; Shinn-Jyh Ding et al., 2010). Uma vez que ambos os cimentos possuem natureza química de suas composições muito semelhantes, e a maioria de seus constituintes é comum (Estrela et al., 2000; Islam et al., 2006).

Outros estudos relatam que a exposição de linfócitos humanos ao MTA e aos cimentos Portland (branco e cinza) não causou

danos genéticos nestas células, para todas as concentrações testadas (Abdulah et al., 2002; Saidon et al., 2003; Aranha et al., 2006; Ribeiro et al., 2006). Talvez porque ambos os cimentos sejam constituídos pelos mesmos grupos químicos (Funteas et al., 2003), exceto pelo fato do cimento Portland branco possuir menor conteúdo ferroso, o que caracteriza sua coloração (Bye et al., 1999; Ribeiro et al., 2006), e por ambos os cimentos Portland não apresentarem bismuto em suas composições (Islam et al., 2006; Funteas et al., 2003). Provavelmente, a semelhança na composição química, explica os mesmos resultados obtidos pelos autores citados nos testes de genotoxicidade entre os cimentos.

No presente estudo os cimentos AHP e MTA-O, ambos na diluição 1:4 e no período de endurecimento dos cimentos de 48 h, foram capazes de aumentar a formação de micronúcleos em oito vezes sobre a cultura de células V79, em relação ao grupo controle não-tratado. Os dados permitem a observação de que o tempo pós-manipulação de 48 h para ambos os cimentos, nesta diluição, seja desfavorável, propiciando a liberação de componentes capazes de estimular danos genéticos ao DNA celular. O restante das diluições dos cimentos testados, dentro das condições do experimento, obteve comportamento genotóxico semelhante ao grupo controle, entretanto bem superiores ao MTA-R.

Na literatura específica não há estudos relacionados com a biocompatibilidade e genotoxicidade do cimento obturador à base de MTA (MTA Fillapex). Acredita-se que a genotoxicidade verificada neste estudo, pode estar relacionada com a liberação de compostos resinosos presentes em sua composição como a resina salicilato. Este constituinte estimulou o processo de apoptose em células de fibrossarcoma humano, além de ter causado a fragmentação de material genético determinando sua precipitação no citoplasma (Mahdi et al., 2006).

O mesmo pode explicar o comportamento biológico do cimento resinoso AH Plus. Além disso, existem evidências provenientes

de análises de mutações genéticas utilizando bactérias bem como células eucarióticas que mostram que a resina epóxica é um componente mutagênico presente no cimento AH Plus, capaz de causar quebras na cadeia do DNA celular (Schweikl, Schmalz, 1991; Schweikl et al., 1995; Schweikl et al., 1998; Huang et al., 2002). Entretanto, Miletic et al. (2003) relataram que o cimento AH Plus não induziu aberrações cromossômicas ou formação de micronúcleos em nenhum período experimental, ao avaliarem a formação de micronúcleos sobre culturas de linfócitos humanos.

Lodiene et al., 2008, observaram severa citotoxicidade e genotoxicidade do AH Plus imediatamente após a manipulação. Porém, neste estudo o AH Plus foi citotóxico em períodos mais longos como 48 e 72 h, principalmente nas concentrações mais altas (1:1 e 1:2), o que impossibilitou uma análise da genotoxicidade dessas diluições devido à morte celular generalizada provocada pelas amostras citadas.

Para um julgamento mais detalhado do potencial genotóxico dos cimentos obturadores, deve ser realizado um maior número de testes (Ribeiro et al., 2006). Diante da diversidade de cimentos endodônticos existentes no mercado, torna-se difícil saber qual é o melhor cimento a ser indicado, entretanto para uma escolha correta, não somente o comportamento biológico, mas também a avaliação conjunta de outros parâmetros como ação antimicrobiana e propriedades físico-químicas devem ser consideradas.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada e com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) o cimento MTA-R manteve a taxa de viabilidade celular acima de 70% para todas as diluições e períodos avaliados;
- b) o cimento MTA-O foi o material mais citotóxico do estudo;
- c) o cimento AHP foi o cimento de citotoxicidade intermediária;
- d) o MTA-R foi o cimento que menos estimulou a formação de micronúcleos, inclusive para o extrato mais concentrado (1:1);
- e) os cimentos MTA-O e AHP, ambos na diluição 1:4 e no tempo de 48 h estimularam a formação de micronúcleos em 8 vezes em relação ao grupo controle não tratado;
- f) o MTA-R foi o material menos citotóxico e genotóxico deste estudo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Abdulah D, Pitt Ford TR, Papaioannou S, Nicholson, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*. 2002;23(19):4001-10.

Almeida WA. Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical [tese]. Faculdade de Odontologia de Araraquara. UNESP- Univ Estadual Paulista; 1997.

Andrighetti-Fröhner CR, Kratz JM, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO. *In vitro* testing for genotoxicity of violacein assessed by comet and micronucleus assays. *Mutat Res*. 2006;603:97–103.

Al-Nazhan S, Al-Judai A. Evaluation of antifungal activity of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2003;29(12):826-7.

Al-Hezaimi K, Al-Hamdan K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rostein I. Effect of white-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro. *J Endod*. 2006;31(9):684-6.

Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. *J Endod*. 2006;32(11):1053-6.

---

\* De acordo com estilo Vancouver International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

Aranha AMF, Lanza CRM, Hebling J, Frederico PG, Costa CAS. Análise da citotoxicidade do agregado de trióxido mineral (MTA-Branco) em cultura de odontoblastos. Influência dos tempos de presa e do armazenamento do material em meio líquido. Rev Odontol Unesp. 2006; 35(4):319-326.

Asgary S, Kamrani FA. Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. J Oral Sci. 2008;50(4):469-74.

Asrari M, Lobner D. *In Vitro* Neurotoxic Evaluation of Root-end-filling Materials. 2003;29(11):743-46.

Balto HA. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. J Endod. 2004; 30(1):25-29.

Batista RF, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TR, Cuman RK et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. J Biomed Mater Res A. 2007;81(1):171-7.

Bernabe PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. Braz Dent J. 2005;16(2):149-55.

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

Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial *In Vitro* Biological Response to Contemporary Endodontic Sealers. J Endod. 2006; 32(10):989-92.

Bortoluzzi EA, Juarez Broon N, Duarte MAH, Demarchi ACO, Bramante CM. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. J Endod. 2006; 32(12):1194-7.

Bonson S, Jeanson BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *Journal of Dental Research*. 2004; 83(5):408-13.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005;20(4):245-54.

Bye GC. Portland cement composition, production and properties, 2<sup>nd</sup> edn, London: Thomas Telford Limited; 1999.

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

Camilleri J, Montesin FE, Papaioannu S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2004;37(10):699-704.

Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006;39(10):747-54.

Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007;40(6):462-70.

Chang YC, Huang FM, Cheng MH, Chou LS, Chou MY. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. *J Endod*. 1998;24(9):604-6.

Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J Clin Pediatr Dent*. 2006;30(3):203-9.

Chen CH, Huang TH, Shie MY, Shinn-Jyh DingSJ, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement (CS) and mineral trioxide aggregate (MTA) biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *J Endod.* 2010;35(5):681-5.

Costa CAS, Bacalhau JT, Hebling J. Estudo preliminar da biocompatibilidade de diferentes cimentos utilizados na terapia pulpar. *RPG: Rev Pos-Grad.* 2003;10:25-36.

Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. *J Endod.* 2011;37(3): 372-5.

D'Anto V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Mesenchymal Stem cells. *J Endod.* 2010; 36(11):1839-43.

Deal BF, Wenckus CS, Johnson BR, Fayad MI. Chemical and physical properties of MTA, Portland cement, and a new experimental material, Fast-Set MTA. *J Endod.* 2002; 28(3):252-7.

De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cemento n human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005;38(9):604-9.

Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater.* 2008;24(3):362-71.

Diamanti E, Kerezoudis NP, Gakis DB, Tsatsas V. Chemical composition and surface characteristics of grey and new white ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2003;36(5):946-7.

Duarte MAH, Demarchi ACO, Moraes IG. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AH Plus. *Int Endod J.* 2004;37(1):42-5.

Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. *Int Endod J.* 2003;36(1):44-8.

Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin calcium hydroxide and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007;40(5):329-37.

Enkel B, Dupas C, Armengol V. Bioactive materials in endodontics. *Expert Rev Med Devices.* 2008;5(4):475-94.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O Jr. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. *Rev Fac de Odontologia de Bauru.* 1994;2(2):31-8.

Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dental J.* 2000;11(1):3-9.

Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod.* 2003;29(12):814-7.

Funteas UR, Wallace JA, Fochtman EW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Australian Dental Journal.* 2003;29(1):43-4.

Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials-histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. *Clin Oral Invest.* 1997;1(1):5-11.

Gomes-Filho JE, Costa MMTM, Cintra LTA, Duarte PCT, Takamiya AS, Lodi CS, Bernabé PFE. Evaluation of Rat Alveolar Bone Response to Angelus MTA or Experimental Light-cured Mineral trioxide Aggregate Using Fluorochromes. *J Endod.* 2011;37(2):250-4.

Haglung R, Safavi KE, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(6):739-45.

Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review, Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003;36(2):75-85.

Hayashi M, Shimizu A, Ebisu S. MTA for obturation of mandibular central incisors with open apices: a case report. *J Endod.* 2004;30(2):120-2.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999;25(3):161-6.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabe PF, Otoboni Filho JÁ. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001;12(1):3-8.

Holland R, Souza V, Nery MJ. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Brazilian Dental Journal.* 2002;25(13):23-6.

Huang TH, Lii CK, Chou MY, Kao CT. Lactate dehydrogenase leakage of hepatocytes with AH 26 and AH-Plus sealer treatments. *J Endod.* 2000;26(9):509-11.

Huang Lee H, Kao CT. Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based, and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *J Endod.* 2001;27(12):744-8.

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

Internacional Standard Organization. ISO 10993-5 (1994).  
Internacional Standard Organiozation. ISO 10993: 1-6. Biological  
evaluation of medical and dental materials and devices, 1992.

Islam I, Chang HK, Yap AU. X-ray diffraction analysis of mineral  
trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J.* 2006;39(3):220-  
5.

Koh ET, McDonald F, Pitt Ford T R, Torabinejad M. Celular Response  
to mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1998;24(8):543-7.

Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Geromichalos GD, Kortsaris AH.  
Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro  
evaluation. *Endod Dent Traumatol.* 1998;14(4):182-5.

Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Panagiotis B,  
Kortisaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc  
oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three  
fibroblastic cell lines. *J Endod.* 2005;31(1):44-6.

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.

Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Silva RS. Realease of  
formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol  
Oral Radiol.* 1999;88(2):221-5.

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

Mahdi JG, Alkarrawi MA, Mahdi AJ, Bowen ID, Human D. Calcium  
salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells.  
*Cell Prolif.* 2006;39(4):249-60.

Miletic I, Jukic S, Anic I, Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Osmak M. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *Int Endod J*. 2003; 36(5):330-5.

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;31(4):307-9.

Miranda RB, Fidel SR, Boller MAA. L929 Cell Response to Root Perforation Repair Cements: an *In Vitro* Cytotoxicity Assay. *Braz Dent J*. 2010;20(1):22-6.

Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectina. *International Endodontic Journal*. 2008;41(11):933–8.

Miyagak DC, Carvalho EMOF, Robazza CRC, Chavasco JK, Levorato GL. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos. *Braz Oral Res*. 2006;20(4):303-6.

Murray PE, LumLey PJ, Smith AJ, Ross HF. The influence of sample dimensions on hydroxyl ion release from calcium hydroxide products. *Endod Dent Traumatol*. 2000;16(6):251-7.

Neto KO, de Moura AAM, Davidowicz. Estudo comparativo da reação tecidual conjuntiva de ratos, frente a três cimentos endodônticos resinosos. *J Health Sci Inst*. 2010;28(1):67-70.

Nogueira I. Atividade antibacteriana e citotoxicidade do agregado de trióxido mineral associado a diferentes concentrações de clorexidina [dissertação], Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara. UNESP- Univ Estadual Paulista; 2008.

Olsson B. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod*. 1981;7(8):355-69.

Pappen AF, Bravo M, Gonzalez-Lopes S, Gonzales-Rodrigues MP. An *in vitro* study of coronal leakage after intraradicular preparation of cast-dowel space. *J Prosthet Dent.* 2005;94(3):214-8.

Perez AL, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and white MTA. *Int Endod J.* 2003;36(8):564–70.

Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Sui Mai S, Cotti et al. *In vitro* cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin– based root canal sealer. *J Endod.* 2008; 34(9):1085-8.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(6):756-63.

Rahbaran S, NgYL, Mann V, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature-part 2; influence of clinical factors. *Int Endod J.* 2008;41(1):6-31.

Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. The biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and Portland cement on dentin enhances the push-out strength. 2010;36(2):286-91.

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

Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Biocompatibility of glass - ionomer cements using mouse lymphoma cells *in vitro*. *J of Oral Rehabilitation.* 2006;33(12):912-7.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques MEA, Salvadori DMF. 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.* 2006;101(2):258-61.

Ribeiro DA, Braz MG, Camargo EA, Salvadori DMF, Marques MEA. Evaluation of genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to mineral trioxide aggregate and Portland cements. *J of Oral Rehabilitation*. 2006; 33(3):234-9.

Ribeiro DA. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(2):251-6.

Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent mater*. 2008;24(2):149-64.

Saidon J, He J, Zhu WQ, Safavi K, Spangberg LZW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(4):483-9.

Santos AD, Moraes JC, Araujo EB, Yukimitu K, Valerio Filho WV. Physicochemical properties of MTA and a novel experimental cement. *Int Endod J*. 2005;38(7):443-7.

Stark LA, Din FVN, Zwacka RM, Dunlop MG. Aspirin induced activation of the NF- $\kappa$ B signalling pathway: a novel mechanism for aspirin mediated apoptosis in colon cancer cells. *Fasbeeb J*. 2001; 15(7):1273–5.

Sazaki YF, Kawaguchi S, Karmaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*. 2002;519(1-2):103–19.

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblastlike cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Archs Oral Biol*. 1991; 36(2):117-28.

Smith WL, Dewitt DL, Shimokawa T, Kraemer SA, Meade EA. Molecular basis for the inhibition of prostanoid biosynthesis by nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Stroke* 1990;21(4) 24–8.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. *J Dent*. 1994;22(2):6-11.

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

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

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

Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod*. 2002;28(11):784-6.

Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W. The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells *in vitro*. *J Dent Res*. 2004;83(1):17-21.

Schweikl H, Hiller K-A, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomater*. 2005;26(14):1713-9.

Shinn-Jyh Ding, Chia-Tze Kao, Chih-Lin Chen, Ming-You Shie, Tsui-Hsien Huang. Evaluation of Human Osteosarcoma Cell Line Genotoxicity Effects of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Silicate Cements. *J Endod*. 2010;36 (7):1158-62.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 2000;32(5):361-9.

Sousa-Neto MD, Marchesan MA, Pecora JD, Junior AB, Silva-Sousa YT, Saquy PC. Effect of Er:YAG on adhesion of root canal sealers. *J Endod.* 2002;28(3):185-7.

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.

Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K . Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2006;39(5):415–22.

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):389-95.

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

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21(7):349-53.

Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12(4):161-78.

Torabinejad M, Masoud P. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive. Literature Review-Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod.* 2010;36(1):16-27.

Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J.* 2002;35(3):245-54.

Ustariz F. Determinación de niveles de fósforo inorgánico y fosfatase alcalina en jóvenes del Estado Mérida-Venezuela. Rev Fac Farm Merida. 1998;34(3):30-4.

Waltimo T, Siren E, Orstavik D, Haapasalo M. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. Int Endod J. 1999;32(2):94-8.

Watanabe, S. Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos cimentos: Endo-CPM-Sealer®, Sealapex® e MTA® [dissertação]. Faculdade de Odontologia de Araçatuba. UNESP- Univ Estadual Paulista; 2008.

Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod. 2004;30(2):95-9.

Yucel AC, Guler E, Guler AU, Ertas E. Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers. J Endod. 2006;32(9):890-3.

Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg SWL. Adhesion of Human Osteoblasts on Root-End Filling Materials. J Endod. 2000;26(7):404-7.

## ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

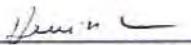
  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / janete@fosjc.unesp.br

---



**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **044/2010-PH/CEP**, sobre “**Citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos obturadores**”, sob a responsabilidade de **CLAUDIA VILLELA BIN**, tendo como orientadora a Profa. Adjunto Marcia Carneiro Valera, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e Normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 21 de setembro de 2010.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Assist. Dra. DENISE NICODEMO**  
Vice-Coordenadora