UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

AMANDA MENON ESTEVES

CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS RETROBTURADORES EXPERIMENTAIS EM FIBROBLASTOS V79

2011

AMANDA MENON ESTEVES

CITOTOXICIDADE DE CIMENTOS RETROBTURADORES EXPERIMENTAIS EM FIBROBLASTOS V79

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientador: Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Co-orientadora: Profª. Tit. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2011

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 26 de agosto de 2011.

Amanda Menon Esteves

E-mail: amanda.esteves@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo (Orientador)
Departamento de Odontologia Restauradora

Profª. Adj. Ana Paula Martins Gomes
Departamento de Odontologia Restauradora

Profª. Drª. Luciane Dias de Oliveira
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 26 de agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força e me guiar sempre para o melhor caminho. Obrigada por estar sempre comigo.

A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP por proporcionar esses quatro incríveis anos de aprendizado.

Ao meu orientador:

Professor Carlos Henrique, obrigada por me acolher na disciplina de Endodontia, por me mostrar um novo lado da odontologia tão interessante. Admiro-te muito. Obrigada por tudo.

À minha co-orientadora:

Professora Márcia, obrigada pelas dicas, orientações e em especial pela dedicação. Você é uma excelente pessoa. Respeito-te muito. Obrigada.

Gleyce e Tatê:

Obrigada por serem ótimas orientadoras e extremamente dedicadas. Adorei ter conhecido e convivido um pouco com vocês duas. Vocês com certeza tornaram a minha pesquisa mais agradável. Muito sucesso a vocês!

A FAPESP:

Pelo apoio à pesquisa e concessão de bolsa para a minha Iniciação Científica.

Ao Carlos Guedes:

Por ter me ajudado na execução do projeto e dos relatórios. Fico muito grata.

Ao Professor Ivan:

Por ter me auxiliado com a sua grande dedicação na Estatística deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Mário e Cristina, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos da minha vida e que me ensinaram tantas coisas boas como ser dedicada, persistente, compreensiva, esforçada e por fim, me ensinaram como é sentir-se amada. Muitíssimo obrigada. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Rafael, que sempre acreditou no meu potencial e me auxiliou em grandes decisões da minha vida. Obrigada por ser esse irmão pentelho. Te amo!

Aos meus avôs e avós: Neide e Jorge (em memória), Maria Helena (em memória) e Henrique (em memória) por darem início a essa família tão especial. Vocês são muito importantes na minha vida. Amo a todos!

A todos familiares, que sempre apoiaram e torceram por mim.

Ao meu namorado, Caio, que apesar da distância sempre se fez presente quando eu mais precisava. Obrigada por tudo. Te amo muito!

As minhas amigas, quase irmãs: Manuella, Camila, Marília e Paola por estarem sempre ao meu lado e por proporcionaram esses quatro anos tão especiais e marcantes na minha vida. Sentirei saudades! Amo cada uma de vocês.

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

Citotoxicidade de cimentos retrobturadores experimentais em fibroblastos V79*

Cytotoxicity of experimental root-end filling materials in V79 cells

RESUMO

Associando as características de adesividade e bom selamento do cimento AH Plus à ação biológica do MTA, Óxido de Zinco e Hidróxido de Cálcio, a proposta deste estudo foi avaliar a citotoxicidade destas associações. Os espécimes dos cimentos e suas associações foram preparados, e colocados em contato com meio de cultura (82,4 mm^2 superfície/mL) logo após a manipulação e deixados em estufa (37°C a 100% umidade) por 24 h. Fibroblastos pulmonares de hamster chinês (V79) foram expostos a diferentes diluições dos cimentos por 24 h e a viabilidade celular foi mensurada pelo teste de MTT. As diferenças entre a taxa de sobrevivência celular foi estatisticamente analisada pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p<0,05$). Todos os cimentos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, com exceção do MTA. A citotoxicidade em relação ao grupo controle cresceu na seguinte ordem: AH Plus < AH Plus + $Ca(OH)_2$ < AH Plus + OxZn< AH Plus + MTA < MTA ($p\leq 0,05$). Concluindo-se que o acréscimo de materiais biocompatíveis com o intuito de melhorar a consistência do cimento AH Plus para utilização em retrobturação não diminuiu significantemente sua toxicidade.

UNITERMOS

Citotoxicidade; AH Plus; MTA; $Ca(OH)_2$.

Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico **Brazilian Dental Science (ISSN 2178-6011).*

ABSTRACT

Combining the characteristics of good adhesion and sealing of the AH Plus sealer the biological properties of the MTA, zinc oxide and calcium hydroxide, the purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of these associations. The specimens of the sealers and their associations were mixed and exposure to culture medium (82.4 mm^2surface/mL) after the manipulation and incubated in a humidified incubator (37°C and 100% humidity) for 24 h. Chinese hamster lung fibroblasts (V79) were exposed to different dilutions of this extracts for 24 h and cell viability was measured by MTT test. The differences between the cell survival rates were statistically analyzed for Kruskal-Wallis and Dunn ($p \leq 0.05$). All sealers showed a significant difference with the group control, except the MTA. Cytotoxicity with the control group increased in the following order:
AH Plus < AH Plus + $Ca(OH)_2$ < AH Plus + OxZn< AH Plus + MTA < MTA ($p \leq 0,05$). It was concluded that the addition of biological materials in order to improve the consistency of AH Plus for use in retro cavities its toxicity has not decreased significantly.

UNITERMS

Cytotoxicity; AH Plus; MTA; Calcium hydroxide.

INTRODUÇÃO

Com o avanço da tecnologia e o surgimento de novas técnicas e materiais para obturação dos canais radiculares, a terapia endodôntica tem obtido maior índice de sucesso.

Entretanto, devido a falhas técnicas ou mesmo a presença de microrganismos persistentes, algumas terapias não são bem sucedidas [1], sendo necessária a realização de retratamento. Neste segundo tratamento, o profissional tem a oportunidade de corrigir falhas ocorridas anteriormente, através de instrumentação mais invasiva do

canal radicular, para que se obtenha um maior acesso às áreas de contaminação, utilizar outra medicação intracanal e por vezes proporcionar o extravasamento da mesma, e até mesmo a utilização de outro cimento obturador que apresente melhores propriedades físico-químicas. Porém, este tratamento nem sempre é viável e nestes casos o profissional deve optar pelo tratamento cirúrgico complementar.

Deste modo, a cirurgia paraendodôntica aparece como excelente alternativa para a resolução de complicações e insucessos decorrentes do tratamento de canal radicular. A proposta dos materiais retrobturadores é criar um selamento apical ou uma barreira de proteção entre os componentes do sistema de canais radiculares e os tecidos perirradiculares no osso alveolar [2]. Entretanto, a exposição dos túbulos dentinários e a falta de adaptação do material restaurador às paredes da retrocavidade podem comprometer a sua eficácia [3].

O cimento retrobturador ideal não deve ser tóxico ou mutagênico, e deve ser biocompatível e insolúvel [2]. Deste modo, a necessidade da avaliação da toxicidade permite identificar os mecanismos biológicos, assim como os de ação, destes materiais, antes de utilizá-los na prática diária.

O MTT vem sendo utilizado para testes de citoxicidade em cultura de células, avaliando o metabolismo mitocondrial das mesmas. Kim et al. [4] estudaram a efetividade do teste MTT para verificação da viabilidade de células de ligamento periodontal. Para esses autores este é um teste rápido, de alta eficácia, fácil manipulação e fornece imediatamente a quantidade e identificação de células viáveis.

Assim como a biocompatibilidade, a fluidez também consta na lista dos requisitos de material de preenchimento ideal da especificação nº 57 da ADA. Porém, entre os materiais obturadores ainda existe diferença de fluidez, entre o mínimo e o máximo requerido pela ADA. Entretanto, para a utilização de um cimento endodôntico como material retrobturador é interessante que este apresente menor fluidez,

tanto para facilidade de inserção quanto para permanência deste material na retrocavidade.

Ultimamente, o mineral trióxido agregado (MTA) tem sido um material extensivamente pesquisado e é o cimento mais utilizado na obturação de cavidades retrógradas. Na endodontia ainda ocorreu nos últimos tempos uma grande evolução nos cimentos resinosos.

O primeiro cimento resinoso foi preconizado por Schröeder [5], que propôs um cimento obturador à base de resina epóxica de BisGMA (Éter de Bisfenol A diglicidil). A partir de então, as pesquisas contribuíram para a melhoria da qualidade desse tipo de cimento que resultou em várias propostas, entre elas o AH Plus (Dentsply). O AH Plus, apesar de possuir capacidade citotóxica e mutagênica, é um cimento endodôntico resinoso de grande popularidade por apresentar propriedades físicas e químicas satisfatórias. Sendo de fácil manipulação, adaptação às paredes do canal radicular e apresenta estabilidade dimensional em longo prazo [6, 7]. Porém, sua fluidez não é favorável para utilização como cimento endodôntico em retrocavidades.

A incorporação de hidróxido de cálcio aos cimentos endodônticos foi sugerida, pois este possui como propriedades: indução de mineralização, baixa citotoxicidade e excelente ação antimicrobiana devido a sua alta alcalinidade (pH 12,8) [8, 9] e, geralmente, promove condições bioquímicas que aceleram a reparação tecidual [10, 11].

Existem estudos na área biomédica, que analisaram a importância de nanopartículas de óxido de zinco devido a sua ação antibacteriana e o uso do mesmo como agentes profiláticos contra infecções bacterianas [12]. Por tanto, foi sugerida a adição do óxido de zinco aos cimentos endodônticos afim de, acrescentar as características antiinflamatórias, antibacterianas e a passividade biológica.

Deste modo, a importância deste estudo está relacionada às propriedades satisfatórias do AH Plus como cimento endodôntico, porém de difícil utilização como material retrobturador devido sua fluidez.

Com o intuito de torná-lo um material menos fluido, algumas associações serão propostas neste estudo. Diante disto, a necessidade da avaliação da biocompatibilidade destas associações torna-se relevante. Assim, a proposta deste estudo foi avaliar a citotoxicidade dos cimentos AH Plus, MTA e algumas associações ao AH Plus, acrescido de óxido de zinco, hidróxido de cálcio e pó de MTA.

MATERIAL E MÉTODO

Cultivo celular

Foram utilizados fibroblastos de *hamster* Chinês (V79 - Banco de células do Rio de Janeiro - BCRJ). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1% (Cultilab Ltda, Campinas, Brasil). Em seguida, foram semeadas em frascos de cultivo (Prolab, São Paulo, Brasil) e após a subconfluência da camada de células, estas foram destacadas com auxílio de solução de tripsina 0,25% (CultilabLtda, Campinas, Brasil). Na sequência, essas células foram semeadas em novo frasco. Após a subconfluência da camada de células, as células foram semeadas em placas com 96 poços (Prolab, São Paulo, Brasil), onde receberam os meios de cultura condicionados. As etapas até a aplicação dos meios condicionados serão descritas a seguir.

Descongelamento das Células

Todos os procedimentos foram realizados dentro da capela de fluxo laminar. Em um frasco grande para cultura de célula (garrafa 75 cm^2 – 270 mL), foram pipetados 10 mL de meio de cultura; esse procedimento foi realizado com antecedência, para que a tensão superficial do frasco e do meio fosse quebrada. Paralelamente, em um tubo de ensaio de 15 mL foram colocados 10 mL de meio de cultura, que serviu para neutralizar o DMSO (dimetilsulfóxido), substância na qual a

célula foi congelada e que em temperatura ambiente torna-se tóxica para as mesmas. Um tubo criogênico foi removido e levado imediatamente para o banho-maria até o descongelamento do mesmo. O tubo foi levado rapidamente para capela de fluxo laminar e o seu conteúdo despejado no tubo de ensaio contendo meio de cultura. O tubo de ensaio foi então levado à centrífuga por 5 min a 1000 rpm e ao ser retirado se observou a formação de um precipitado de células, chamado de *pellet.* Na capela, o meio de cultura sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio fresco e então colocadas no frasco para cultura de células previamente preparado. O frasco foi levado ao microscópio de luz invertida para verificação da presença de células e posteriormente à estufa atmosférica a 37º C com tensão de $CO_2$5%.

Plaqueamento

Para o plaqueamento as células foram contadas em câmara de Neubauer e uma suspensão de $5x10^3$ células em 200µL de meio de cultura foi plaqueada em cada poço da placa de 96 poços.

Em cada período, foram utilizados quatro espécimes (poços) por grupo por concentração. As placas foram levadas à estufa a 37º C onde permaneceram por 24 h, até o momento da colocação do meio de cultura condicionado. Foram realizados três experimentos independentes, obtendo assim, doze espécimes por período, para cada concentração de cada grupo experimental.

Divisão dos Grupos Experimentais

Neste estudo foi avaliada a resposta de culturas celulares de fibroblastos de hamster chinês (V79) frente aos cimentos retrobturadores, para isso foram estabelecidos cinco grupos: AH Plus (Dentsply De Trey, Alemanha); AH Plus associado ao hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$ p.a; AH Plus associado ao óxido de zinco (OxZn); AH Plus associado ao pó do MTA (Mineral Trióxido Agregado) branco (Angelus, Brasil); e MTA branco (Angelus, Brasil). Os cimentos foram colocados em

contato com o meio de cultura imediatamente após a espatulação, sendo avaliados no tempo de endurecimento 0 h.

Os cimentos AH Plus e MTA foram preparados de acordo com as instruções do fabricante sob condições assépticas para prevenir risco de contaminação bacteriana durante os testes de toxicidade. As associações foram medidas em um medidor de material odontológico e este, foi utilizado como padrão de medida para todas as associações e nomeadas de volume. Os materiais foram preparados das seguintes maneiras: 2 volumes do AH Plus + 3½ volumes de $Ca(OH)_2$ p.a.; 2 volumes AH Plus + 7 volumes de OxZn; 2 volumes AH Plus + 4 volumes de pó de MTA branco.

Estas proporções foram escolhidas previamente para que o cimento tivesse uma consistência ideal para inserção em cavidades de retrobturação.

Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, para prevenir riscos de contaminação bacteriana durante os testes de citotoxicidade. Os cimentos foram preparados e acondicionados em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) de modo que o cimento ocupasse a área total do fundo do poço, de diâmetro 16,2 mm, e apresentasse 2 mm de altura. Após, cada poço foi preenchido com 2,5 mL de meio de cultura e as placas permaneceram em estufa de 5% CO_2 a 37°C por 24h.

Em seguida, 2 mL de meio foram removidos do contato com os espécimes formando os extratos originais (1:1) de cada material e congelados para posterior utilização. Os extratos originais (1:1) foram preparados seguindo as recomendações da ISO 10993 em uma proporção de 82,4 mm^2 da área da superfície do espécime por mL de meio de cultura. No momento dos testes, os extratos originais foram descongelados e para cada grupo foram utilizadas diluições seriadas: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, sendo estas aplicadas em culturas celulares

previamente plaqueadas e cultivadas por 24 h. Testes primários foram realizados para avaliar a resposta celular a estas diluições pelo período de 24 h de exposição das culturas aos extratos.

Os extratos dos cimentos foram colocados dentro de placas de 96 poços, sendo que cada poço foi preenchido com 200 μL dos extratos e/ou meio de cultura, em quadriplicada para cada diluição. Os testes foram independentes e realizados em triplicata para cada grupo.

Ensaio de citotoxicidade

Para o teste de citoxicidade, as diluições foram colocadas em contato com fibroblastos pulmonares de *hamster* Chinês (V79). As células foram descongeladas e cultivadas em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica-antimicótica a 1%MEMα a 37°C e 5% CO_2.

Em uma placa de 96 poços, uma quantidade de 5×10^3 células em 200 µL por poço e incubadas por 24 h a 37°C. Após este período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas a 200 µL das diluições seriadas dos extratos dos cimentos e das pastas isoladamente. Foram utilizados 200 µL de meio de cultura para o controle negativo (sem células) e 200 µL de meio para o controle positivo (com células) e estas foram incubadas em estufa de 5% CO_2 a 37°C por 24 h.

Após este período, a viabilidade celular foi determinada pela mensuração da atividade da succinildesidrogenase (SDH). A atividade da SDH, indicativa da função mitocondrial, foi mensurada pelo ensaio de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio; Sigma, St Louis, MO, USA) e foi quantificada pela dissolução do MTT em 0,1 N NaOH (6,25 v/v%) em DMSO (Dimetil Sulfóxido) . A leitura da densidade óptica resultante da solução foi mensurada em um espectrofotômetro a 570nm (AsdysHitech). A citotoxicidade foi expressa em valores de porcentagem comparada ao grupo controle.

Ensaio de MTT

A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio por coloração pelo MTT, que é reduzido pelas células vivas, adquirindo coloração azul. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pela substância no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do MTT. 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 AldrichCo., Alemanha) em 1 mL de solução de PBS. Como essa solução é sensível a luz, foi mantida protegida com papel alumínio. O meio de cultivo foi removido das placas e 100 µL da solução de MTT foram adicionados em cada poço. Cada placa foi então envolvida em papel alumínio e permaneceu na estufa por uma h. Após este período, O MTT foi removido e foi adicionados 100 µL de DMSO (Sigma AldrichCo., Alemanha) em cada poço, permanecendo na estufa por 10 min. Ao término deste período o conteúdo dos poços foi agitado por mais 10 min e a placa foi levada à leitora (AsysHitechGmbH, Áustria) previamente programada. A quantificação da inibição enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância foram submetidos à análise quanto à porcentagem de viabilidade celular pela atividade mitocondrial das células e foi feita uma comparação quanto a viabilidade celular após a aplicação de cada controle.

Análise Estatística

Os dados de citotoxicidade obtidos para as variáveis em estudo foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial com a ajuda do programa computacional PRISM (GraphPad, version 5.0, 2007) e Statistix (version 8.0, Analytical Software, 2005).

A análise descritiva consistiu no cálculo das medidas de: a) tendência central (média e mediana); b) dispersão (faixa, desvio padrão e faixa inter- quartil) e representação gráfica (gráfico de colunas e esquema dos cinco números, *Box-Plot*).

A análise inferencial consistiu no teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis e de comparação múltipla de Dunn.

O nível de significância foi o valor convencional de 5%.

RESULTADOS

A citotoxicidade dos componentes dos cimentos retrobturadores foi determinada nas células de fibroblastos V79 após um período de exposição de 0h (imediatamente após a manipulação) utilizando-se o teste de MTT. Os componentes testados foram citotóxicos, contudo os efeitos variaram bastante entre as diferentes diluições.

As porcentagens de células viáveis, diante das diferentes diluições dos materiais após os testes, estão expressas na (Tabela 1 e Figura 1).

Como resultado dos testes de citotoxicidade quanto a sobrevivência celular para os diferentes cimentos retrobturadores (Tabela 1 e Figura 1), pudemos observar que, o AH Plus apresentou maior citotoxicidade que os demais materiais em todas as diluições, exceto na diluição 1:4 em que a associação AH Plus + OxZn foi mais citotóxico.

Isoladamente, o cimento AH Plus obteve melhora na citotoxicidade com o aumento das diluições dos extratos originais podendo ser observado 75% de viabilidade celular na diluição 1:32.

Ademais, o AH Plus + $Ca(OH)_2$, o AH Plus + MTA e o AH Plus + OxZn seguiram o mesmo padrão do AH Plus, ou seja, aumentaram sua viabilidade celular ao longo das diluições seriadas.

Entretanto, o MTA apresentou um comportamento diferenciado dos demais materiais, obtendo nas concentrações originais 1:1 e nas diluições 1:2 valores altos de viabilidade celular: 107% e 110%, respectivamente. A partir das diluições 1:4 até a diluição 1:16 houve regressão dessas viabilidades, finalizando na diluição 1:32 com 82%, sendo ainda um material não citotóxico.

Tabela 1- Valores médios (% de células viáveis), segundo o tipo de componente e de diluição.

COMPONENTE	DILUIÇÃO					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
AH Plus	0,7	4,7	37,7	38,6	57,9	75,1
*AH Plus + $Ca(OH)_2$	26,3	27,5	41,3	64,9	85,4	107,1
AH Plus + MTA	2,85	10,88	58,04	81,7	112,2	136,9
**AH Plus + OxZn	19,58	19,24	27,61	58,71	83,27	97,06
MTA	107	110	96,5	86,7	85,7	82,6

*AH Plus + $Ca(OH)_2$ = AH Plus + Hidróxido de Cálcio
** AH Plus + OxZn = AH Plus + Óxido de Zinco

As diferenças estatísticas entre os materiais nas diferentes diluições estão expressas na Tabela 2. A influência dos extratos dos materiais na sobrevivência celular pode ser classificada da maior toxicidade para a menor: AH Plus <AH Plus+ $Ca(OH)_2$ < AH Plus + OxZn < AH Plus + MTA < MTA com diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p \leq 0,05$).

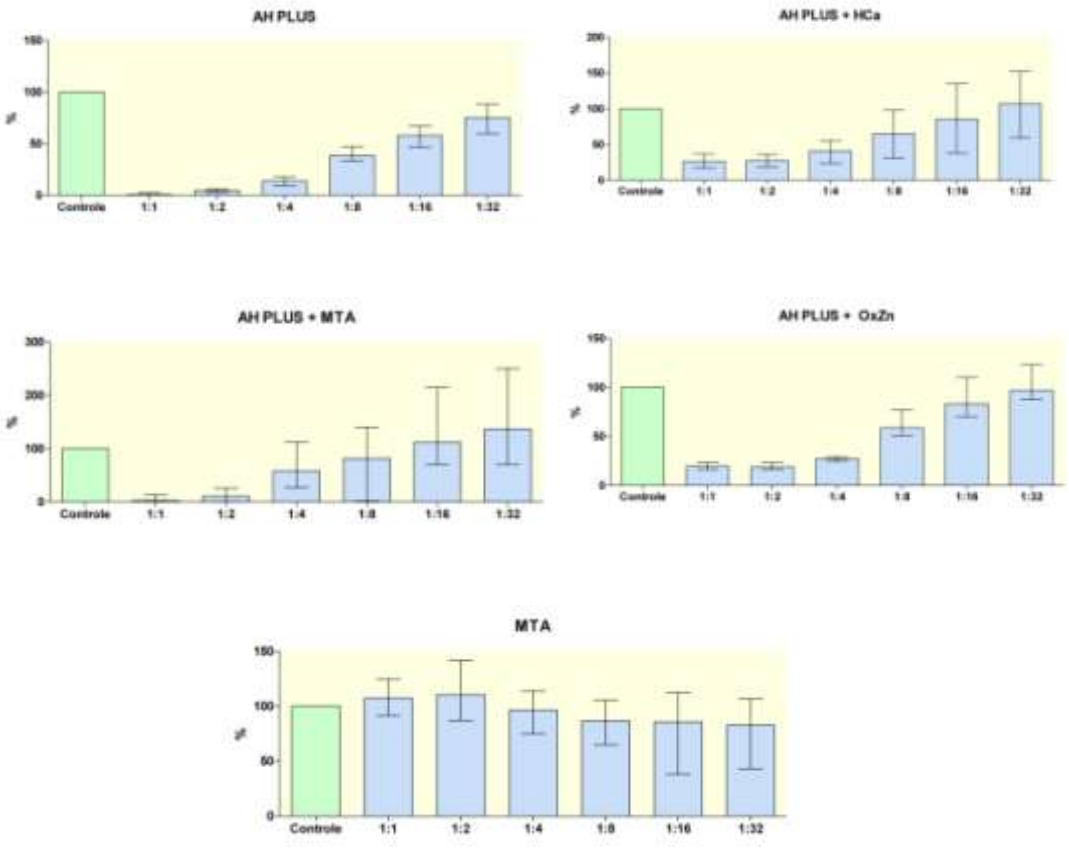

Figura 1 - Esquema dos cinco números (box-plot) dos valores (%) de células viáveis, segundo o tipo de componente e de diluição.

Tabela 2 - Resultado do teste de Dunn (5%) após Kruskal-Wallis, na comparação dos componentes entre si, em cada diluição

COMPONENTES	DILUIÇÃO					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
MTA	A	A	A	A	A	AB
AH Plus + $Ca(OH)_2$	AB	AB	B	A	A	A
AH Plus + OxZn	BC	BC	BC	AB	A	AB
AH Plus + MTA	CD	CD	AB	A	A	A
AH Plus	D	D	C	B	B	B

*Letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes entre os grupos.

DISCUSSÃO

O requisito mínimo para o contato de materiais retrobturadores com os tecidos biológicos é a biocompatibilidade.

Neste estudo, associações ao cimento endodôntico AH Plus foram realizadas com o intuito de promover menor fluidez e maior estabilidade a este cimento para sua utilização como material retrobturador.

No presente estudo, foi utilizada uma linhagem permanente de células de fibroblastos pulmonares de *hamster* chinês (V79) e a citotoxicidade de componentes de cimentos endodônticos foi mensurada utilizando extratos obtidos a partir destes materiais (método indireto). Com o uso do método indireto, uma situação clínica também pode ser mimetizada, já que o tempo de presa ou polimerização dos materiais é realizado em ambiente úmido, permitindo que o estudo seja ainda mais clinicamente relevante [13].

Eldeniz et al. [14] relatam que quanto mais fresco o cimento é colocado para a obtenção do extrato, maior é a citotoxicidade, e mais próximos da realidade são os resultados, uma vez que, clinicamente, os cimentos são colocados imediatamente após a manipulação, similarmente, neste presente estudo, o tempo de análise foi de zero h ou imediatamente após a manipulação visando essa simulação clínica.

A maioria dos estudos utiliza o ensaio de MTT para análise de citotoxicidade *in vitro* de materiais dentários, o qual se baseia na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan insolúvel. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria por meio da ação da enzima succinatodesidrogenase fornecendo, então uma medida de função mitocondrial das células [15]. Kim et al. [4] estudaram a efetividade do teste MTT para verificação da viabilidade de células de ligamento periodontal. O MTT vem sendo utilizado para testes de citoxicidade em cultura de células, avaliando o metabolismo mitocondrial das mesmas.

Para esses autores este é um teste rápido, de alta eficácia, fácil manipulação e fornece imediatamente a quantidade e identificação de células viáveis. Da mesma forma, Eldeniz et al. [14] concordam com a eficácia do MTT na avaliação do metabolismo celular após contato das células com diferentes produtos e consideram este teste simples, rápido e que garante resultados reais.

Neste estudo, foram realizadas análises para verificar a citotoxicidade por ensaios de MTT entre os cimentos endodônticos e suas associações sobre cultura de fibroblastos de *hamster* chinês (V79) nos extratos originais (1:1) e suas diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 no período de zero h. A sobrevivência celular foi avaliada e comparada ao grupo controle, mostrando presença de citotoxicidade nas diversas diluições.

Como mostram os resultados deste estudo, o cimento AH Plus foi o material mais citotóxico quando comparado aos demais cimentos. O AH Plus apresentou reduzida sobrevivência celular nas diluições 1:1 e 1:2 e apresentou um aumento da mesma na diluição 1:4. Nas diluições seguintes ocorreu um pequeno aumento progressivo da sobrevivência celular, obtendo melhores resultados na diluição 1:32.

A intensa citotoxicidade encontrada nos extratos originais (1:1) e nas diluições mais concentradas (1:2, 1:4 e 1:8) podem ser resultantes da liberação de formaldeído, após a manipulação do cimento AH Plus. Embora o fabricante do cimento à base de resina epóxica AH Plus alegar que este material não libera formaldeído em relação ao seu precursor AH 26, sua citotoxicidade inicial pode ser atribuída à liberação de formaldeído pelas aminas adicionadas para acelerar a polimerização epóxica [14] ou ao seu componente resinoso [14].

Miletic et al. [16] mostraram que o AH Plus apresentou alta citotoxicidade imediatamente após o preparo e após 24h e 48h de tempo de endurecimento em contato com células de carcinoma cervical de humanos (HeLa) e fibroblastos de rato L929. Após período de 7 e 30

dias, não foi observado destruição nas culturas celulares após aplicação direta do AH Plus. Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste estudo e também com outros que mostraram citotoxicidade em diferentes níveis [14, 17, 18, 19].

Em contraste aos resultados aqui mostrados, Lodiene et al. [20] relatam que o AH Plus não exibiu citotoxicidade após tempo de endurecimento de 24 h no teste de difusão em filtro e no teste de MTT, utilizando as mesmas células. Em contrapartida, quando avaliado logo após a manipulação, este último estudo mostrou efeitos tóxicos no teste de difusão em filtro.

Já a associação do AH Plus + OxZn mostrou-se bem citotóxico até a diluição 1:4. Porém, a partir da diluição 1:8 houve um aumento da sobrevivência celular e alcançou valores impressionantes nas diluições 1:16 e 1:32. Semelhantemente, ocorreu com o AH Plus + $Ca(OH)_2$, onde até as diluições 1:4 obtiveram aspectos tóxicos, a partir da diluição 1:8 houve uma melhora significativa e atingiu ótimos valores nas diluições 1:16 e 1:32. E ainda, o AH Plus + MTA, nas diluições iniciais (1:1 e 1:2) apresentou-se com características tóxicas, sendo que na diluição 1:4 ocorreu uma melhora. As diluições 1:8 e 1:16 apresentaram o mesmo comportamento, sendo estes, melhores que as diluições anteriores, e na diluição 1:32, obteve-se um resultado muito satisfatório e bem semelhante as outras duas associações com o AH Plus.

Contudo, o MTA teve um comportamento diferenciado por apresentar desde a diluição 1:1 um resultado muito bom em relação a toxicidade. Porém, ao longo das diluições houve um decréscimo de valores, mostrando então seu comportamento menos satisfatório quando realizou-se a sua diluição.

Estudos em humanos e animais afirmam que o MTA e cimento de $Ca(OH)_2$ são capazes de induzir a formação de barreira dentinária. Accorinte et al. [21] analisaram a resposta histomorfológica *in vivo* de dentes humanos capeados com MTA ou cimento de $Ca(OH)_2$.

Após 30 dias do tratamento, uma diferença significante do cimento de $Ca(OH)_2$ em relação ao MTA foi observada na formação de barreira dentinária. O MTA parece ter uma vantagem em induzir reparação em períodos de tempo mais curtos, entretanto, em 60 dias, ambos os materiais apresentaram resultados similares. O MTA é rico em óxido de cálcio o qual reage com a água e os fluidos tissulares, formando hidróxido de cálcio. O $Ca(OH)_2$ é capaz de liberar íons cálcio e hidroxila que provocam um aumento do pH [22, 23, 24]. Fridland e Rosado [24] verificaram altos valores de pH, enfatizando que o principal componente químico do MTA, capaz de manter um pH alto em solução aquosa, é pela formação do $Ca(OH)_2$. Os autores relatam que em 78 dias o MTA apresentou altos valores de pH o que pode ser atribuído a continua liberação de $Ca(OH)_2$ por este material.

A manutenção de um alto pH ao longo do tempo pelo MTA pode apresentar relevância clínica uma vez que a alcalinidade cria um ambiente favorável para a divisão celular e para a reparação [25]. De-Deus et al. [26] verificaram que o MTA (Pro-Root e Angelus) e o cimento Portland foram citotóxicos em 24 h de exposição às células endoteliais humanas, provavelmente porque o alto pH destes cimentos causou desnaturação das proteínas das células adjacentes.

Entretanto, Cavalcanti et al. [13] relatam que o cimento de $Ca(OH)_2$ não foi capaz de mudar o comportamento de fibroblastos pulpares de dentes permanentes humanos, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na sobrevivência e proliferação celular comparado ao grupo controle, sendo um material, portanto, não citotóxico nas condições em que o estudo foi realizado.

Takita et al. [24] relatam que o MTA branco apresentou uma maior proliferação celular em células pulpares humanas que o cimento de $Ca(OH)_2$. Estes resultados estão de acordo com Camargo et al, [18] onde foi verificado que o MTA exibiu uma taxa de sobrevivência celular semelhante ao grupo controle em células pulpares humanas.

Em outras linhagens celulares humanas ou animais, estudos mostram também que o MTA é capaz de manter a viabilidade celular próxima de 100%. O comportamento do MTA (ProRoot e Angelus) foi avaliado e apresentaram baixa citotoxicidade em células V79 e macrófagos murino [27].

O MTA não foi citotóxico para células L929 nem para fibroblastos humanos gengivais [28]. Entretanto, alguns estudos relatam que osteoblastos primários apresentaram uma baixa viabilidade celular quando em contato com MTA [29] e que o MTA (ProRoot e Angelus) reduziu em 20% a viabilidade celular de fibroblastos humanos gengivais após 72 h [30].

Alguns autores acreditam que uma das principais razões para o MTA provocar indução de proliferação celular e ser um material não citotóxico pode ser devido à contínua liberação de íons cálcio por este material [23, 24]. Após 24 h, o MTA liberou uma grande quantidade de íons cálcio e induziu proliferação celular, sendo um material não citotóxico, entretanto, após 28 dias observou–se baixo crescimento celular e isso pode ser decorrente da menor quantidade de íons cálcio disponível [23]. No entanto, Takita et al. [24] relatam que a contínua liberação de íons cálcio pelo MTA durante 14 dias promoveu um aumento na proliferação das células pulpares *in vitro*.

Apesar do MTA e óxido de zinco não serem materiais que apresentam citotoxicidade, suas associações e do $Ca(OH)_2$ com AH Plus não diminuíram a citotoxicidade do AH Plus no presente estudo, sendo semelhantes ao cimento AH Plus isoladamente.

Assim, diante da diversidade de cimentos endodônticos existentes no mercado, torna-se difícil saber qual é o cimento mais indicado, entretanto para uma correta escolha, não somente o comportamento biológico, mas também a avaliação conjunta de outros parâmetros como as propriedades mecânicas, físicas, químicas e microbianas devem ser considerados.

Apesar de se acreditar em uma melhora da citotoxicidade do cimento AH Plus pelo acréscimo significativo de óxido de zinco, hidróxido de cálcio, não foi o que ocorreu, provavelmente por que a liberação de formaldeído, aminas e outros produtos não foram minimizadas ou impedidas pelo acréscimo destes produtos. Contudo mais estudos devem ser realizados para que se possam aliar as propriedades de biocompailidade do MTA com a adesividade de um cimento resinoso como o AH Plus, para que tenhamos um material retrobturador biocompatível e com propriedades físico-químicas satisfatórias.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada pode-se concluir que: a) Os materiais testados foram citotóxicos, exceto o MTA que apresentou os melhores resultados, sendo semelhante ao grupo controle, b) A associação AH Plus + MTA apresentou-se tóxico apenas na concentração original e na diluição 1:2, enquanto que as associações AH Plus + $Ca(OH)_2$ e AH Plus + OxZn foram citotóxicos até a diluição 1:4, c) O AH Plus foi capaz de induzir citotoxicidade em quase todas as diluições, tendo mais de 50% de viabilidade somente a partir da diluição 1:16.

REFERÊNCIAS

1. Miserendino LJ, Pick RM. Lasers in Dentistry. Chicago: Quintessence Books; 1995. 341 p.

2. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. Dent Clin North Am. 1992 Apr;36(2):357-78.

3. Rud J, Andreasen JO. A study of failures after endodontic surgery by radiographic, histologic and stereomicroscopic methods. Int J Oral Surg. 1972;1(6):311-28.

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

5. Schroeder A. The impermeability of root canal filling material and first demonstrations of new root filling materials. SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd.1954 Sep;64(9):921-31.

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

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

8. Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. Dent Mat. 2005 Jul;21(7):599-607.

9. Witherspoon DE, Small JC, Harris GZ. Mineral trioxide aggregate pulpotomies: a case series outcome assessment. J Am Dent Assoc. 2006 May;137(5):610-8.

10. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felippe Júnior O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. Rev Fac de Odont de Bauru. 1994;2(4):31-8.

11. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felippe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz Dent J. 1995;6(2):85-90.

12. Taccola L, Raffa V, Riggio C, Vittorio O, Iorio MC, Vanacore R, et al. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. Int J Nanomedicine. 2011;6:1129-40. Epub 2011 May 30.

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

14 Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. Int Endod J. 2007 May;40(5):329-37. Epub 2007 Fev 19.

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

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

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

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

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

20. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavic D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. Int Endod J. 2008 Jan;41(1):72-7. Epub 2007 Oct 10.

21. Accorinte Mde L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan Jr E, et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. J Endod. 2008 Jan; 34(1):1– 6.

22. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. Braz Dent J. 2002;13(1): 23-6.

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

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

25. Fridland M, Rosado R. MTA solubility: a long term study. J Endod. 2005 May; 31(5):376-9.

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

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

28. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod. 1998 Fev;24(2):91-6.

29. Pérez 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 Aug;36(8):564-70.

30. Guven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts *in vitro*. J Endod. 2007 Apr;33(4):447-50.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comitê de Ética em Pesquisa-Local
Envolvendo animais

São José dos Campos, 11 de maio de 2011

Oficio nº 05/2011/CEPa

Prezado Senhor

Esclarecemos que não há necessidade do projeto intitulado **"Estudo da citotoxicidade de cimentos retro-obturadores experimentais em células V79"** de sua responsabilidade, tendo como orientada a aluna Amanda Menon Esteves, ser analisado por este Comitê, porque a pesquisa em tela não envolve a utilização de vertebrados e sim fibroblastos de hamster chinês, comercialmente disponível, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei "Arouca".

Atenciosamente,

Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

Prof.Adjunto CARLOS HENRIQUE RIBEIRO CAMARGO
Unesp-Campus de SJCampos