

Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa

Estudo dos mecanismos envolvidos na
migração celular induzida pelo
hidróxido de cálcio para bolha de ar
subcutânea em camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia, Campus de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia (Área de concentração :
Odontopediatria)

Orientador : Prof Dr. João Eduardo Gomes Filho
Co-orientadora : Profa. Dra Sandra Helena Penha Oliveira

ARAÇATUBA
2005

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

C837e Costa, Mariana Machado Teixeira de Moraes
Estudo dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea em camundongos / Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa. -- Araçatuba : [s.n.], 2005.
164 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2005
Orientador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho; Co-orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Penha Oliveira.

1.Hidróxido de Cálcio. 2.Movimento celular. 3.Antiinflamatórios.

Black D27
CDD 617.601

Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa

Estudo dos mecanismos envolvidos na
migração celular induzida pelo hidróxido de
cálcio para bolha de ar subcutânea
em camundongos

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Presidente e Orientador : Prof Dr. João Eduardo Gomes Filho

2º. Examinador : Prof Dr. Carlos Ferreira dos Santos

3º. Examinador : Prof Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé

Araçatuba, 28 de Janeiro de 2005

Dados Curriculares

MARIANA MACHADO TEIXEIRA DE MORAES COSTA

Nascimento	10 de fevereiro de 1979 – Lapa/PR
Filiação	Araken Lisboa de Moraes Costa Thais Machado Teixeira de Moraes Costa
1998 – 2001	Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2002 – 2003	Curso de especialização em Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2003 – 2005	Curso de Pós-graduação em odontopediatria, nível de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Dedicatória

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais, **Araken** e **Thais**,*

*e ao meu irmão, **Rodrigo**,*

pelo amor, dedicação e apoio constante.

Obrigada por tudo o que representam

em minha vida !

*Ao meu namorado, **José Otávio**,*

pelo companheirismo, compreensão

e incentivo, aumentando a minha força

a cada dia !

Agradecimentos Especiais

*A **Deus**, em primeiro lugar,*

Razão de toda a minha história,

Pelo dom da vida,

E pela oportunidade de realizar este estudo,

Dando-me forças nos momentos difíceis.

Agradeço por todas as oportunidades que recebi...

algumas que soube aproveitar,

outras não soube reconhecer.

As pessoas que colocou

De uma maneira muito especial

Em meu caminho...

Agradeço Senhor !

Agradecimentos Especiais

Ao Professor Dr João Eduardo Gomes Filho,

Agradeço imensamente a dedicação e seriedade

com que conduziu este estudo,

e a paciência com que orientou meus passos.

Obrigada pelo aprendizado e confiança,

Incentivando-me sempre nesta escolha

Celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas,

dando-lhes sempre algum significado.

Muito obrigada !

À Professora Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira,

Agradeço por toda paciência e auxílio,

Pela orientação segura e admirável,

sem qual seria impossível

a realização deste trabalho.

Existem pessoas que entram em nossas vidas por acaso,

mas não é por acaso que elas permanecem.

Obrigada de todo coração!

Agradecimentos Especiais

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP – na pessoa dos professores Dr. Paulo Roberto Botacin, digníssimo Diretor e Dr. Célio Percinoto, digníssimo Vice-Diretor.

Aos meus colegas de turma, Karine, Rebeca, Fernanda, Karina e Kélio, pelos momentos de alegria e companheirismo. É nas situações mais difíceis, confusas e complicadas que você descobre quem são seus verdadeiros amigos.

A todos os meus colegas do curso de Pós-graduação em Odontopediatria, pessoas especiais que tive o prazer de conhecer, por todos os momentos que passamos juntos.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profa. Dra., Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar e Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery.

Ao corpo docente do curso de Pós-graduação em odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP - , pelas orientações valiosas e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos Alessandra Cristina Gomes e Flávio Augusto Martins Gabas por todo o apoio durante na realização do trabalho.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, Mário Luís da Silva, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira e Cleide da Silva Oliveira, por terem sempre nos acolhido e ajudado da melhor maneira possível.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP – Araçatuba, Luzia Anderlini, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Maria Cláudia de Castro Benez, Cláudia Frare, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Jéssica Duberger Neves, Marina Alves dos Santos, Izamar da Silva Freitas, Helena Sumika Sanomiya Otsuki e Claudio Hideo Matsumoto, sempre dispostos a ajudar, com muito carinho e paciência.

Agradecimentos Especiais

À Marina e Valéria, da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pelo profissionalismo e pela atenção.

À técnica Giuliana Bertozi, do Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo apoio e auxílio e pela dedicação no tratamento dos animais.

Ao Biotério de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, por ter cedido as matrizes dos animais utilizados neste estudo

As agências financiadoras que permitiram a realização deste trabalho – CAPES , FAPESP

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

COSTA, MMTM. Estudo dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea em camundongos. Araçatuba, 2005. 164p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O objetivo deste trabalho foi investigar a migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea em camundongos. Observou-se que a migração de neutrófilos ocorreu de maneira dose-dependente, alcançando o pico de migração 96 horas após a injeção do estímulo. Esta migração foi inibida com o pré-tratamento dos animais com indometacina (5mg/Kg), meloxicam (5mg/Kg) e dexametasona (1mg/Kg), diferentemente, o MK886 (1mg/Kg) foi inefetivo neste processo. Constatou-se também que os animais estimulados com hidróxido de cálcio apresentaram um aumento significativo na liberação de citocinas e quimiocinas (KC, MIP-2, IL1 β e TNF α). O pré-tratamento com meloxicam ou aminoguanidina inibiu a liberação de KC, MIP-2, IL1 β , mas não de TNF α . O pré-tratamento com Tioglicolato a 3% aumentou cerca de 167% a população de macrófagos na bolha de ar subcutânea, entretanto, não alterou a migração de neutrófilos. Pôde-se concluir que a migração de neutrófilos para bolha de ar subcutânea

induzida pelo hidróxido de cálcio, em camundongos, foi dependente de KC, MIP-2, IL1 β e TNF α , sendo a liberação destes mediadores independente de mastócitos e de macrófagos.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio; Movimento celular; Citocinas.

ABSTRACT

COSTA, MMTM. *Study of the mechanisms involved in cellular migration induced by calcium hydroxide to air-pouch in mice*. Araçatuba 2005.

164p. Dissertation (Master in Pediatric Dentistry) – Dental School of Araçatuba, Paulista State University “Júlio de Mesquita Filho”.

The aim of this study was to investigate the cellular migration induced by calcium hydroxide to air-pouch in mice. It was observed that the migration developed dependently to the doses and achieved the peak 96 hours after the stimulation. Neutrophil migration was inhibited with the pre-treatment with indometacin (5mg/Kg), meloxicam (5mg/Kg) and dexamethasone (1mg/Kg). Differently, MK886 (1mg/Kg) was ineffective in this process. It was seen that the animals stimulated with calcium hydroxide showed an increase of cytokines and chymokines (KC, MIP-2, IL1 β e TNF α) release. Pre-treatment with meloxicam or aminoguanidine inhibited KC, MIP-2, IL1 β release, but not TNF α . Release of TNF α was not dependent of prostaglandines and nitric oxide because it was not inhibited by aminoguanidine and meloxicam. Pre-treatment with Tioglocolate 3% increased 167% the macrophage population in the air-pouch. However, it did not change neutrophil migration. It was possible to conclude that the neutrophil migration to the air-pouch induced by calcium hydroxide in mice was dependent on KC,

MIP-2, IL1 β , TNF α and prostaglandins and it was not dependent on the mast cells and macrophages.

Key-words: Calcium hydroxide. Cell movement. Cytokines.

Sumário

Lista de Figuras	19
Lista de Tabelas	21
Lista de Abreviaturas	22
1 Introdução	25
Revisão da Literatura	
1.1 Aspectos gerais da inflamação	30
1.1.1 Alterações vasculares	31
1.1.2 O exsudato inflamatório.	32
1.1.3 Eventos celulares: extravasamento de leucócitos	33
1.1.4 Mediadores da resposta inflamatória	37
1.1.4.1 Metabólitos do ácido araquidônico	38
1.1.4.2 Citocinas e quimiocinas	44
1.1.4.3 Óxido Nítrico	47
1.1.5 O papel do neutrófilo no processo inflamatório	49
1.2 Indicações clínicas do hidróxido de cálcio	53
1.2.1 Efeito mineralizador	55
1.2.2 Efeito antimicrobiano	56
1.3 Propriedades gerais do hidróxido de cálcio	58
1.3.1 Dissociação iônica	59
1.3.2 Variações de pH	60
1.3.3 Uso de diferentes veículos	63
1.4 Processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio	68
1.4.1 Efeito do hidróxido de cálcio sobre células	73
2 Proposição	77
3 Material e Método	
4.1 Animais	79
4.2 Procedimento experimental	80
4.2.1 Migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio	80
4.2.1.1 Determinação da Concentração-efeito	81
4.2.1.2 Determinação do tempo-resposta	83
4.2.2 Contagem global	84

Sumário

4.2.3	Contagem diferencial	84
4.2.4	Efeito do pré-tratamento com diferentes drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos	86
4.2.5	Aumento da população de macrófagos com tioglicolato a 3%	88
4.2.6	Determinação da produção de TNF, KC e MIP-2 no exsudato da bolha de ar subcutânea de camundongos estimulados por hidróxido de cálcio	88
4.3	Análise Estatística	89
4	Resultados	
4.4	Avaliação da migração de células para bolha de ar subcutânea induzida por diferentes concentrações de hidróxido de cálcio	91
4.5	Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea	96
4.6	Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio	98
4.7	Determinação da produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 no exsudato da bolha de ar subcutânea de camundongos estimulados por hidróxido de cálcio	100
5	Discussão	103
6	Conclusão	119
7	Referências	122
	Anexos	161

Lista de Figuras

FIGURA 1	Obtenção de ar estéril utilizando um fluxo laminar	79
FIGURA 2	Injeção do ar estéril no tecido subcutâneo	79
FIGURA 3	Bolha de ar subcutânea	80
FIGURA 4	Injeção do estímulo	80
FIGURA 5	Pressão digital para difusão do PBS	81
FIGURA 6	Incisão para acessar a bolha de ar subcutânea	81
FIGURA 7	Obtenção do lavado da bolha de ar subcutânea	82
FIGURA 8	Tubos identificados contendo o lavado	82
FIGURA 9	Diluição em Líquido de Turk	83
FIGURA 10	Câmara de Neubauer	83
FIGURA 11	Centrifugação do exsudato	84
FIGURA 12	Descarte do Sobrenadante	84
FIGURA 13	Preparação das lâminas para contagem diferencial	85
FIGURA 14	Coloração das laminaas	85
FIGURA 15	Concentração-efeito da migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio	92
FIGURA 16	Tempo-resposta da migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio	92
FIGURA 17	Tempo-resposta da migração de células mononucleares induzida pelo hidróxido de cálcio	94
FIGURA 18	Efeito da drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio	96

Lista de Figuras

- FIGURA 19 A e B** Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio 98
- FIGURA 20** Determinação da produção de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL1-}\beta$, KC e MIP-2 no exsudato da bolha de ar subcutânea de camundongos estimulados por hidróxido de cálcio 100

Lista de Tabelas

Tabela 1	Pré-medicação com diferentes drogas antiinflamatórias	86
-----------------	---	----

Lista de Abreviaturas

BSA	Soro albumina bovina
CAMs	Moléculas de adesão celular
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CINC- 1	Proteína quimiotática induzida por citocinas
COX	Ciclooxigenase
Dexa	Dexametasona
EPM	Erro Padrão da Média
fMLP	Metionil-leucil-fenilalanina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular – 1
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular – 2
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
Indo	Indometacina
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄

LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LXA ₄	Lipoxina A ₄
LXB ₄	Lipoxina B ₄
Melox	Meloxicam
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão salina-fosfato
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular

1 *Introdução*

É de extrema importância para o odontopediatra buscar manter na cavidade bucal da criança os dentes decíduos com alterações por trauma ou cárie até a época de sua esfoliação fisiológica, já que estes dentes são a base fundamental para que a correta oclusão da dentição permanente tenha êxito, evitando problemas como a perda de espaço. Outro fator de extrema importância, característico da dentição decídua, é que o ciclo vital desses dentes é bem mais curto que o dos permanentes, incluindo em seu processo de envelhecimento a reabsorção radicular fisiológica progressiva, até sua completa esfoliação (TOLEDO, 2000; GUEDES PINTO, 2003).

No entanto, algumas patologias podem acometer os dentes decíduos durante o seu ciclo vital, como por exemplo, cárie e traumatismo, os quais podem ocasionar alterações pulpaes levando à necessidade de tratamento endodôntico, como a pulpotomia ou a pulpectomia.

Para manutenção de um dente na cavidade bucal, a pulpectomia pode ser indicada em casos onde exista evidência de inflamação crônica ou necrose da polpa radicular. Tal procedimento é contra

indicado em dentes com grande perda de estrutura radicular, reabsorção interna ou externa avançadas ou infecção periapical envolvendo a cripta do sucessor permanente (TOLEDO, 2000; GUEDES PINTO, 2003).

O tratamento endodôntico, particularmente os procedimentos biomecânicos, envolvem a remoção de microrganismos e seus produtos. Em seqüência, para evitar a reinfecção do espaço já limpo e preparado, deve-se preencher o canal radicular com um material que permita uma completa obturação e possua propriedades físicas e biológicas aceitáveis (HOLLAND et al., 1981; DIAS et al., 1988; ESTRELA et al., 1995; TANOMARU FILHO et al., 2002). A seleção da medicação intracanal tem como referencial três parâmetros principais: o potencial antimicrobiano, a histocompatibilidade e a capacidade de induzir a reparação tecidual (ESTRELA et al., 1995).

O material ideal para a obturação dos dentes decíduos deve apresentar um grau semelhante de reabsorção à raiz decídua, ser inofensivo aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente, reabsorver imediatamente quando levado além do ápice, ser anti-séptico, preencher os canais radiculares com facilidade, aderir às paredes, não contrair, ser facilmente removido quando necessário, ser radiopaco e não pigmentar o dente (TOLEDO, 2000; GUEDES PINTO, 2003).

Além disso, para que um cimento seja biocompatível, ele deve ser atóxico, não causar necrose tecidual e ser rapidamente aceito pelos tecidos sem manter uma seqüela inflamatória (HOLLAND et al., 1981; ESTRELA et al., 1994; TOLEDO, 2000; GUEDES PINTO, 2003).

O hidróxido de cálcio tem sido amplamente empregado na odontologia, devido a propriedades como biocompatibilidade, ação antimicrobiana e atuação como um material indutor de mineralização (HOLLAND et al., 1981; DIAS et al., 1988; GIRO et al., 1991; ÇALISKAN, 1994; ESTRELA et al., 1995; TANOMARU FILHO et al., 2002.). Assim, o hidróxido de cálcio tem sido empregado em várias situações clínicas como capeamento pulpar, pulpotomia, curativo de demora, material obturador de dentes permanentes e decíduos, em dentes traumatizados, em apicificações, em Dens in dente, em reabsorções dentárias, em perfurações radiculares (HEITHERSAY, 1975; HOLLAND et al., 1981; DIAS et al., 1988; GIRO et al., em 1991; ÇALISKAN, 1994; PANZARINI et al., 1998; HOSOYA et al., 2001; TANOMARU FILHO et al., 2002).

Diversos estudos têm sido realizados, utilizando-se modelos experimentais variados, para observar a resposta tecidual frente ao uso do hidróxido de cálcio, em polpa de cães (DIAS et al., 1988; LEONARDO et al., 1993; PANZARINI et al., 1998; TANOMARU FILHO et al., 2002), polpa de macacos (CVEK et al., 1987; KITASAKO et al.,

2002, HOLLAND et al., 2002) e subcutâneo de ratos (ECONOMIDES *et al.*, 1995; NELSON FILHO et al., 1999; HOLLAND et al., 2002).

Apesar dos inúmeros trabalhos constatados na literatura, poucos se preocupam com o estudo detalhado do processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio, fato importante para análise do reparo tecidual. Portanto, torna-se necessário conhecer melhor esse processo, bem como as células e mediadores químicos envolvidos nesta resposta inflamatória.

2 *Revisão da Literatura*

2.1 Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é uma reação local dos tecidos a agressões de diversas naturezas, ocorrendo como resposta inespecífica e sendo caracterizada por uma série de alterações que tendem a limitar os efeitos dessa agressão. A resposta inflamatória está estreitamente ligada ao processo de reparação, servindo para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo, livrando o organismo da causa inicial da lesão celular e de suas conseqüências. Ocorre no tecido conjuntivo vascularizado e inclui plasma, células circulantes, vasos sangüíneos e constituintes celulares e extracelulares desse tecido. As células circulantes envolvidas nessa resposta são os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas, enquanto no tecido conjuntivo podemos encontrar os mastócitos, fibroblastos, macrófagos residentes e células eventuais. A matriz extracelular consiste em proteínas fibrosas estruturais (colágeno, elastina), glicoproteínas aderentes (fibronectina, laminina, colágeno não-fibrilar) e proteoglicanos (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999; COLLINS, 2000).

A inflamação divide-se em padrões agudo e crônico, sendo que a inflamação aguda se apresenta como uma resposta imediata e precoce a um agente nocivo. Tem uma duração relativamente curta, podendo persistir desde minutos até poucos dias, dependendo da natureza e intensidade do estímulo. Este processo é caracterizado pelo predomínio de fenômenos exsudativos, permitindo o acúmulo de líquido, fibrina, leucócitos e hemácias na região inflamada. Já a inflamação crônica possui uma duração mais longa podendo persistir semanas ou meses. Neste processo, além dos fenômenos exsudativos, ocorrem no local os fenômenos produtivos, envolvendo a proliferação de vasos, fibroblastos, como também a migração e proliferação de monócitos e linfócitos (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999; COLLINS, 2000).

2.1.1 Alterações vasculares

Durante o processo inflamatório, são liberados mediadores químicos que promovem a dilatação e o aumento de permeabilidade dos vasos sangüíneos, permitindo um maior afluxo de sangue para a área agredida, bem como a exsudação de líquidos, proteínas e leucócitos para o espaço intersticial. As alterações começam pouco após a lesão e se desenvolvem em velocidades variáveis, de acordo

com a intensidade da lesão (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999; COLLINS, 2000).

2.1.2 O exsudato inflamatório

Nas reações vasculares de menor intensidade, em que não ocorre dilatação suficiente das junções endoteliais para proporcionar a saída de proteínas plasmáticas, acumula-se no tecido intersticial um líquido rico em água e cristalóides e pobre em proteínas, denominado transudato. Já em agressões de maior intensidade, pode ocorrer um maior aumento da permeabilidade vascular, permitindo a exsudação de um líquido com constituição semelhante à do plasma, rico em macromoléculas e células, denominado exsudato. Esse exsudato inflamatório é importante na contenção e limitação do agente responsável pela injúria, já que dilui esse agente, facilitando sua remoção. Traz também para o local agredido células leucocitárias que atuam na modulação da resposta inflamatória (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999; COLLINS, 2000).

Além dos leucócitos, que são células do sistema imune, células estruturais, tais como células endoteliais, mesoteliais, epiteliais e fibroblastos também podem estar relacionados com a resposta

inflamatória, auxiliando ou potencializando essa resposta (BELLINGAN, 2000).

2.1.3 Eventos celulares: extravasamento de leucócitos

O transporte de leucócitos para o local da injúria é de fundamental importância para limitar os efeitos da agressão e favorecer o reparo tecidual. Esse processo ocorre envolvendo etapas de marginação, rolamento, aderência, diapedese e migração dos leucócitos até o local da injúria (BUTCHER, 1991).

Devido aos fenômenos vasculares envolvidos na resposta inflamatória, ocorrem alterações hemodinâmicas que permitem aos leucócitos assumirem uma posição mais periférica, ao longo do endotélio vascular, sendo conhecido esse processo por marginação leucocitária. Posteriormente, ocorre uma etapa de rolagem destes leucócitos ao longo do endotélio, onde receptores específicos na superfície das células leucocitárias podem ser ocupados pelas moléculas de adesão do endotélio, ativando assim o próximo passo, que envolve uma adesão mais firme. Esse processo de rolagem pode ser reversível, ocorrendo uma dissociação entre o endotélio e as células leucocitárias (MULLER, 2002).

Existem diversos mecanismos que induzem a aderência leucocitária durante o processo inflamatório, podendo variar de acordo com a duração da inflamação, tipo de estímulo e as condições do fluxo sanguíneo (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999).

Os receptores de aderência que atuam nesse processo de extravasamento de leucócitos para os tecidos intersticiais podem ser do grupo das selectinas, integrinas, imunoglobulinas e glicoproteínas. As interações iniciais entre leucócitos e células endoteliais durante o processo de rolagem são mediadas pelas selectinas. A segunda etapa desse mecanismo de adesão, a qual ocorre de maneira mais firme, envolve as moléculas da família das integrinas (ETZIONI et al., 1999).

As selectinas são diferenciadas em selectinas-L, selectinas-P e selectinas-E. As selectinas-L contribuem para a migração de linfócitos e neutrófilos para os locais de inflamação. As selectina-P, que atuam de maneira versátil, tanto como receptores de células endoteliais quanto de plaquetas, são específicas para leucócitos como neutrófilos, macrófagos e linfócitos-T de memória. São estocadas em grânulos na células endoteliais, sendo rapidamente translocadas para a superfície celular em resposta a diversos estímulos inflamatórios (ULBRICH et al., 2003). A rápida obtenção da selectina-P para a superfície da célula endotelial por estímulos como a histamina e a trombina, indicam o papel desse receptor na fase inicial do recrutamento de neutrófilos para os

locais de inflamação (IMHOF; DUNNOM, 1997; MEAGER, 1999; MULLER 2002).

A selectina-E é induzida na superfície de células endoteliais, em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e LPS, estando envolvida na adesão de neutrófilos e de linfócitos-T (IMHOF; DUNNOM, 1997; MEAGER, 1999; MULLER, 2002; ULBRICH et al., 2003). A expressão máxima dessas moléculas ocorre entre 4 a 6 horas após o estímulo, decaindo rapidamente quando passado esse período (MEAGER, 1999).

As integrinas são moléculas de adesão envolvidas em inúmeros processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, manutenção da integridade dos tecidos e atuação de leucócitos nos processos inflamatórios. Quando ativadas, as integrinas das células leucocitárias interagem com moléculas de adesão celular (CAMs), da família das imunoglobulinas, presentes no endotélio (IMHOF; DUNNOM, 1997).

A interação entre integrinas e as moléculas de adesão celular (CAMs) da família das imunoglobulinas é particularmente importante na resposta inflamatória. Nessa etapa, os leucócitos encerram a rolagem e começam a mover-se mais lentamente ao longo da superfície endotelial (ULBRICH et al., 2003).

As CAMs, da família das imunoglobulinas, constituem proteínas expressas em diferentes tipos celulares. Entre essas imunoglobulinas encontramos as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1 e ICAM-2) e as moléculas de adesão da célula vascular (VCAM-1) (COLLINS, 2000; MULLER, 2002; ULBRICH et al., 2003). No endotélio, a ICAM-1 é fracamente expressa e a VCAM-1 é ausente, porém essa expressão é rapidamente aumentada com a ativação endotelial, conseqüente da reação inflamatória (IMHOF; DUNNOM, 1997).

A reação inflamatória que promove a expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, selectina-P, selectina-E, é mediada por citocinas pró-inflamatórias. Mediadores produzidos por macrófagos (como a IL-1 e o TNF) ou liberados de linfócitos-T (Interferon- γ) são chamados de citocinas de alarme. Durante o processo inflamatório, ocorrem diversas mudanças na estrutura endotelial. Essas mudanças resultam do contato do endotélio com essas citocinas de alarme, as quais induzem a expressão de moléculas de aderência. (MEAGER, 1999). Poucos minutos após a estimulação com essas citocinas, as células endoteliais produzem quimiocinas, LTB₄ e PAF, os quais podem ativar integrinas na rolagem de leucócitos (IMHOF; DUNNOM, 1997).

Os leucócitos aderidos ao endotélio podem atingir o espaço intersticial devido à transmigração através das junções celulares. Dessa maneira, as células leucocitárias estendem pseudópodes nessas

junções, atingindo o tecido intersticial através de uma reestruturação do seu citoesqueleto. Entretanto essa transmigração também pode ocorrer através das células endoteliais, em um processo conhecido por transcitose (COLLINS, 2000; KVIETYS; SANDIG, 2001; LUSCINSKAS et al., 2002). Após passar pelas células endoteliais, os leucócitos migram através da lâmina basal para a matriz extracelular dos tecidos intersticiais em direção a um gradiente quimiotático (COLLINS, 2000; MULLER, 2002).

2.1.4 Mediadores da resposta inflamatória

A resposta vascular e celular da inflamação é mediada por fatores químicos desencadeados pelo estímulo inflamatório, os quais atuam como sinais de quimiotaxia para orientação da migração dos leucócitos, podendo ser provenientes do plasma ou das células. Os mediadores do plasma estão presentes em formas precursoras que devem ser ativadas, a fim de atingir suas propriedades biológicas. Os mediadores provenientes das células, normalmente presentes nos grânulos intracelulares, precisam ser secretados ou, então, são sintetizados originalmente. A maioria dos mediadores atua, inicialmente, ligando-se a receptores específicos nas células-alvo, mas podem apresentar uma atividade enzimática direta. Um mediador químico

também pode estimular a liberação de mediadores secundários, os quais, por sua vez, tanto podem ser idênticos ou semelhantes aos mediadores iniciais, como podem ter atividades opostas, constituindo mecanismos de amplificação, modulação ou neutralização da resposta inflamatória. A ação desses agentes pode ser específica para um ou mais tipos celulares, tendo alvos difusos, de acordo com o tipo de tecido e a intensidade do processo inflamatório (COLLINS, 2000). Dentre os mediadores químicos mais importantes, estão as aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteases plasmáticas (sistema complemento, sistema de cininas e sistema de coagulação), citocinas e quimiocinas, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas e os metabólitos do ácido araquidônico (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999; COLLINS, 2000).

2.1.4.1 Metabólitos do Ácido Araquidônico

Os metabólitos do ácido araquidônico, ou eicosanóides, são responsáveis pelo controle de muitos processos fisiológicos, estando entre os mais importantes mediadores e moduladores da resposta inflamatória (Serhan et al., 1996).

O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, que é derivado diretamente de fontes alimentares ou pela

conversão do ácido graxo essencial, o ácido linoléico. Não ocorre livremente na célula, mas normalmente é esterificado em fosfolipídios de membrana e em menor escala nos glicerídeos das membranas celulares. Quando as células são ativadas por estímulos de diferentes naturezas, os lipídeos de suas membranas são remodelados para gerar mediadores biologicamente ativos, atuando como sinais intra ou extracelulares. A etapa inicial desse processo é a liberação do araquidonato, a qual ocorre em uma ou duas etapas. Quando envolve somente uma etapa, a enzima responsável por esse processo é a fosfolipase A₂. Quando em duas etapas, o processo envolve a enzima fosfolipase C e depois a diacilglicerol-lipase ou a fosfolipase D seguida pela Fosfolipase A₂. A fosfolipase A₂ é encontrada intracelularmente ou nos líquidos extracelulares, sendo a primeira forma apontada como responsável pela geração de mediadores inflamatórios. O ácido araquidônico livre é metabolizado por duas classes principais de enzimas, sendo as ciclooxigenases, que resultam na formação de prostaglandinas e tromboxanos, e as lipoxigenases, originando os leucotrienos e as lipoxinas (COLLINS, 2000).

A ciclooxigenase é classificada atualmente em três formas, sendo a COX-1, COX-2 e COX-3 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). A COX-1 é encontrada em diversas células como enzima constitucional a qual participa de uma série de eventos fisiológicos, particularmente no estômago, intestino, plaquetas e rins. A COX-2, divide-se em COX-2a,

constitutiva, e COX-2b, induzida, as quais apresentam um importante papel nesse processo e no mecanismo da dor (HAWKEY, 1999). A ciclooxigenase é encontrada ligada ao retículo endoplasmático, tendo uma ação inicial que oxigena o araquidonato, seguida de ciclização produzindo o endoperóxido cíclico PGG₂, e uma ação da peroxidase que converte PGG₂ em outro endoperóxido cíclico o PGH₂ (LANDS, 1981). A COX-3 pode ser encontrada de forma considerável no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002) e, diferentemente da COX-1 e COX-2, não resulta na produção de prostanóides pró-inflamatórios e sim de produtos antiinflamatórios desta família, sendo encontrada na fase tardia do processo inflamatório (WILLOUGHBY et al., 2000).

As etapas subseqüentes diferem de acordo com os tipos celulares, levando ao início da biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (prostanóides), sendo os principais produtos da via da ciclooxigenase a PGE₂, PGI₂ (Prostaciclina), PGD₂, TXA₂, PGF_{2α}. Esses prostanóides possuem uma grande variedade de atuações. A PGD₂ e a PGI₂ causam vasodilatação e inibem a agregação de plaquetas, enquanto o TXA₂ causa vasoconstrição e agregação plaquetária. As ações da PGE₂ incluem a vasodilatação, produção de febre, inibição da proliferação de células T e inibição da ativação de macrófagos.

Portanto, o TXA_2 e a PGI_2 atuam com papéis opostos, modelando a resposta inflamatória e o processo de hemostasia (COLLINS, 2000).

Dados da literatura demonstraram que macrófagos isolados após uma infecção bacteriana aguda, demonstraram uma diminuição na produção de PGE_2 , PGI_2 e LTC_4 , enquanto conservaram a síntese de TXA_2 . Esse fato parece estar relacionado com o alto influxo de monócitos provenientes do sangue, os quais apresentam características metabólicas diferentes dos macrófagos residentes, ocorrendo, simultaneamente, uma diminuição do metabolismo do ácido araquidônico e um aumento do número de macrófagos após a infecção bacteriana (TRIPP et al., 1986).

A outra via do metabolismo do ácido araquidônico ocorre através da ação das três enzimas lipoxigenases, presentes apenas em alguns tipos celulares, resultando na formação dos leucotrienos e das lipoxinas. São enzimas solúveis localizadas no citossol, sendo encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima desse grupo é a 5-lipoxigenase, predominante nos neutrófilos, sendo a primeira enzima na biossíntese dos leucotrienos. Na ativação celular, esta enzima é translocada para a membrana celular, onde se associa à proteína ativadora da 5-lipoxigenase, necessária à síntese de leucotrienos. A etapa seguinte é a síntese do leucotrieno A_4 (LTA_4), que pode ser convertido enzimaticamente em LTB_4 e é o precursor do LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 e LTF_4 , que são os cisteinil

leucotrienos. O LTB₄ é um potente ativador das respostas funcionais de neutrófilos, atuando na aderência de leucócitos ao endotélio, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (COLLINS, 2000).

O LTB₄ demonstrou estar envolvido na migração de eosinófilos para cavidade peritoneal de ratos, induzida pelo Sephadex (OLIVEIRA et al., 2002) ou por solução salina (OLIVEIRA et al., 1994). Nesses estudos, essa ação quimiotática do LTB₄ ocorreu de forma indireta, podendo ser dependente da atuação de mastócitos (OLIVEIRA et al., 2002) ou de mastócitos e macrófagos (OLIVEIRA et al., 1994) presentes na cavidade peritoneal. A migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos, também pôde ser induzida pelo LTB₄ através de um mecanismo dependente de mastócitos e macrófagos residentes (RIBEIRO et al., 1997).

As lipoxinas, também metabolizadas pelas enzimas lipoxigenases, possuem diversas atuações pró-inflamatórias e antiinflamatórias. Inibem a quimiotaxia e aderência dos neutrófilos, porém estimulam a aderência de monócitos (MADDOX et al., 1998). A LXA₄ estimula a vasodilatação e atenua a vasoconstrição induzida pelo LTC₄. Existe, portanto, uma quantidade inversa de lipoxinas e leucotrienos, sugerindo que as lipoxinas podem ser reguladores negativos da ação dos leucotrienos (BRADY, 1995).

Existem, portanto, diversas drogas antiinflamatórias que atuam inibindo a formação de metabólitos do ácido araquidônico, em diferentes etapas desse processo. Os antiinflamatórios não esteroidais possuem propriedades analgésica, antitérmica, antiinflamatória e anti-trombótica. Sua ação decorre da inibição da síntese de prostaglandinas e tromboxanos, efetuada mediante a inativação das ciclooxigenases 1 e 2 (VANE, 1971; LANDS, 1985; GILROY et al., 1998; MULLER, 2004). Muitos desses fármacos atuam inibindo as isoformas COX-1 e COX-2, embora ocorram variações quanto a essa inibição (MEADE et al., 1993; MITCHELL et al., 1993). O uso de baixas concentrações de dois antiinflamatórios não-esteroidais, aspirina e indometacina, inibiram a produção enzimática de prostaglandinas (VANE, 1971). Antiinflamatórios não esteroidais como a aspirina, diclofenacos e ibuprofeno podem atuar inibindo a ação da COX-3, fartamente expressa no sistema nervoso central (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Os antiinflamatórios que atuam com inibição específica de enzima COX-2, mais recentes, têm sido considerados igualmente efetivos em processos inflamatórios, além de não causarem aumento significativo na incidência de úlceras gastrintestinais (GILROY et al., 1998; SMITH et al., 1998).

Os glicocorticóides pertencem à outra classe de antiinflamatórios, os quais atuam nas células-alvo, atravessando-as por difusão passiva e ativando um receptor citoplasmático. Este complexo corticosteróide-

receptor penetra no núcleo das células, combinando-se com sítios específicos da cromatina. Subseqüentemente, ocorre a transcrição de um RNA mensageiro, promovendo a síntese de proteínas efetoras da ação corticosteróide. Tais proteínas são conhecidas como lipocortinas (anexina-1), que inibem de forma seletiva a enzima fosfolipase A₂, responsável pela geração dos metabólitos do ácido araquidônico no foco inflamado, como as prostaglandinas e leucotrienos (BUCKINGHAM; FLOWER, 1997; LOLIS, 2001; BAUGH; BUCALA, 2002).

2.1.4.2 Citocinas e Quimiocinas

São proteínas sintetizadas por diversos tipos celulares, as quais modulam as funções de outras células, exercendo um importante papel no processo inflamatório. As citocinas são produzidas durante respostas imunes e inflamatórias, sendo sua liberação transitória e estreitamente regulada. Podem atuar influenciando a síntese ou a ação de outras citocinas, ligando-se a receptores específicos nas células alvo. Podem atuar também sobre as mesmas células que as produziram, sobre células próximas ou sistemicamente, como qualquer outro hormônio. As citocinas são agrupadas em classes, de acordo com suas funções ou com a natureza das células-alvo. Existem citocinas que regulam a

ativação, crescimento e diferenciação dos linfócitos. Entre elas, estão a IL-2 e IL-4. Outro grupo envolve as citocinas que atuam na imunidade natural, estimulando diretamente o aumento da aderência de leucócitos a células endoteliais, ao qual pertencem o TNF- α , a IL-1, os interferons do tipo I e a IL-6 (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999; COLLINS, 2000).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos, linfócitos e mastócitos, sendo capaz de produzir collagenase, PGE₂ e IL-6, enquanto o TNF- β é produzido por células T ativadas (ELIAS et al., 1987). Seu potente efeito pró-inflamatório resulta da sua capacidade em aumentar a expressão das moléculas de adesão endotelial e, subseqüentemente, promover a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular (WITKO-SARSAT et al., 2000).

A IL-1 é uma citocina fundamental na resposta do organismo à invasão de microorganismos, reações imunológicas e injúria tecidual. Tanto a IL1- α como a IL1- β são produzidas em grande quantidade por macrófagos e apresentam propriedades pró-inflamatórias, sendo que a segunda tem uma atuação mais potente (TATAKIS, 1993).

A produção de IL-6 é induzida por IL-1, TNF- α , IFN- γ . Essa citocina atua também mediando a destruição do tecido inflamado, sendo que seu efeito biológico ultrapassa aqueles da IL-1 e TNF- α (SHALABY et al., 1989). Dados experimentais demonstraram que essas citocinas são capazes de induzir migração de neutrófilos (FACCIOLI et al., 1990).

As quimiocinas são um grupo específico de citocinas que compartilham a capacidade de estimular o movimento leucocitário (quimiocinese) e o movimento dirigido (quimiotaxia), sendo particularmente importantes na inflamação. Atualmente as quimiocinas são classificadas de acordo com a posição dos resíduos de cisteínas localizados na porção amino terminal da molécula. Quatro classes de quimiocinas estão descritas: CXC, CC, C e CX₃C. As quimiocinas atuam em células-alvo por meio de receptores específicos ligados a proteínas G, caracterizados por apresentarem 7 domínios transmembrânicos. Após a ligação com o receptor, a sinalização é realizada pela proteína G, que por meio de suas subunidades desencadeia eventos bioquímicos que resultam nos efeitos que as quimiocinas exercem sobre as células (MURDOCH; FINN, 2000).

As quimiocinas C-X-C ou α atuam principalmente sobre os neutrófilos, sendo a IL-8 um exemplo desse grupo. São secretadas por macrófagos ativados, células endoteliais e outros tipos celulares, promovendo a ativação e quimiotaxia de neutrófilos (BICKEL, 1993). São expressas em resposta a atuação de LPS, TNF- α , IL-1 β e imunocomplexos (DEFORGE et al., 1992). Outro grupo de quimiocinas é classificado como C-C ou β , as quais geralmente atuam na quimiotaxia de monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, mas normalmente, não sobre neutrófilos. Um terceiro grupo, as quimiocinas C ou γ , são

relativamente específicas para linfócitos (TEIXEIRA et al., 1997). As quimiocinas CX₃C, mais recentemente descritas, também promovem a aderência de leucócitos ao endotélio e atuam como agente quimiotático (BAZAN et al., 1997).

2.1.4.3 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO), ou monóxido de nitrogênio, é um gás solúvel, produzido não somente por células endoteliais, mas também por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e por neurônios específicos no cérebro. É derivado da L-arginina, através da ação das isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na forma constitutiva (cálcio dependente) e induzida (cálcio independente) (VANE et al., 1994; WITKO-SARSAT et al., 2000).

Em um modelo experimental avaliando a atuação dessas enzimas na inflamação aguda e no tecido granulomatoso, foi observado um aumento significativo da atividade das NOS, após 24 horas. Esse aumento da atividade das NOS esteve associado a uma diminuição da atuação das isoformas da enzima COX, podendo indicar um mecanismo regulatório de agentes pró e antiinflamatórios (Vane et al., 1994).

O óxido nítrico atua sobre as células alvo através da indução do monofosfato de guanosina, o qual, por sua vez, desencadeia diversos eventos intracelulares produzindo, por exemplo, o relaxamento das

células do músculo liso vascular. Atua, portanto, na função vascular durante a resposta inflamatória, sendo um vasodilatador potente. Sua atuação ocorre somente em células próximas do local onde é produzido, sendo que essa ação restrita explica sua especificidade (COLLINS, 2000). O NO também age reduzindo a agregação e a aderência plaquetária, inibe diversas características da inflamação induzida por mastócitos e serve como regulador do recrutamento de leucócitos. O bloqueio da produção de óxido nítrico sob condições normais, ocasiona a rolagem e aderência de leucócitos nas vênulas pós-capilares. A administração de óxido nítrico exógeno reduz o recrutamento de leucócitos nos processos inflamatórios agudos. A produção excessiva de óxido nítrico por neurônios específicos é um mecanismo compensatório endógeno que reduz o recrutamento de leucócitos nas repostas inflamatórias (Assreuy et al., 1993).

2.1.5 O papel do neutrófilo no processo inflamatório

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa no processo inflamatório. Originam-se de células da medula óssea, passando à circulação após atingirem a maturação. Na circulação permanecem por cerca de 6 a 7 horas, deixando os vasos em direção ao tecido intersticial, onde se mantêm por volta de 2 dias. São células fagocitárias, sendo que este processo ocorre através do reconhecimento e fixação do

agente agressor, seu engolfamento e a destruição ou degradação do material ingerido. Os grânulos dos neutrófilos possuem enzimas essenciais para a lise das substâncias fagocitadas, como mieloperoxidases, lisozimas, elastases, catepsinas, proteases, collagenases, glicerofosfatases (MONTENEGRO; FECCHIO, 1999). As metaloproteinases, como as collagenases, são estocadas em grânulos específicos, atuando principalmente sobre o colágeno do tipo I (WITKO-SARSAT et al., 2000). Portanto, o transporte intracelular de proteínas e sua secreção no meio extracelular representam um mecanismo de extrema importância na atividade dos neutrófilos (WITKO-SARSAT et al., 2000).

A transmigração dos neutrófilos ocorre principalmente através das bordas das células endoteliais, onde são observadas descontinuidades das junções intercelulares. Em alguns processos inflamatórios os neutrófilos também podem migrar através do epitélio das células endoteliais, chegando aos tecidos inflamados (WITKO-SARSAT et al., 2000).

Os neutrófilos possuem diversos receptores para agentes quimiotáticos, os quais podem atuar na aderência celular, migração, degranulação e nas respostas oxidativas. Entre os diversos fatores que promovem a quimiotaxia de neutrófilos, podemos encontrar o TNF- α (LUKACS et al., 1995; COLLINS, 2000), a IL-8 (BICKEL, 1993;

PERETTI et al., 1994; WITKO-SARSAT et al., 2000), o PAF (WITKO-SARSAT et al., 2000, COLLINS, 2000) e o LTB₄ (NAGY et al., 1982; WITKO-SARSAT et al., 2000). Por outro lado, as lipoxinas são mediadores químicos que podem atuar inibindo a quimiotaxia e aderência de neutrófilos (COLLINS, 2000).

Muitos estudos têm demonstrado o papel do TNF- α na quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos. Dados da Literatura demonstraram uma migração de neutrófilos entre 8 e 24 horas e de eosinófilos entre 48 e 72 horas, para o interstício das vias aéreas, em um modelo experimental em ratos. Um aumento precoce de TNF- α , foi observado entre os períodos de 1 a 8 horas após a injeção do estímulo. Os animais que receberam tratamento para neutralizar esse mediador, apresentaram uma diminuição no recrutamento de neutrófilos e de eosinófilos para o pulmão e para as vias aéreas (LUKACS et al., 1995). Em outro estudo, foi possível observar que a IL-8 e o PAF, ocasionaram uma rápida porém acentuada, alteração na rigidez de neutrófilos, demonstrando alterações na expressão de moléculas de adesão nessas células. Esses mediadores também atuaram ocasionando um aumento da migração de neutrófilos na microcirculação pulmonar (DROST; MACNEE, 2002). A IL-8 induz uma migração de neutrófilos dose-dependente para a cavidade peritoneal de ratos, porém não para bolha de ar subcutâneo, onde os mastócitos residentes não estão presentes.

Dessa forma, a migração de neutrófilos induzida pela IL-8 é dependente de CINC-1 liberada de mastócitos, visto que esta quimiocina foi detectada no exsudato inflamatório após estimulação com a IL-8 (RAMOS et al., 2003).

O LTB₄ é um potente quimiotático e ativador das respostas funcionais de neutrófilos, como a agregação e a aderência dessas células ao endotélio, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (NAGY et al., 1982; COLLINS, 2000). A migração de neutrófilos, induzida pelo LTB₄, ocorre através de um mecanismo dependente de macrófagos e mastócitos residentes (RIBEIRO et al., 1997).

O IFN- γ também possui um importante papel no controle do recrutamento de neutrófilos durante a evolução de uma resposta imunológica, em parte através da regulação da síntese de quimiocinas pelas células residentes (ROBSON et al., 2001).

Os neutrófilos também podem atuar sintetizando diversas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL1- α e IL1- β), antiinflamatórias e outras citocinas e fatores de crescimento (WITKO- et al., 2000). A produção desses mediadores por neutrófilos pode ser modulada por mediadores como o IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 (ROMAGNANI, 1994). O IFN- γ exerce um efeito positivo sobre os neutrófilos, induzindo a produção de citocinas inflamatórias. Ao contrário, a IL-10, a IL-4 e a IL-

13 atuam diminuindo a produção dessas citocinas pelos neutrófilos, especialmente a IL-8 (WITKO-SARSAT et al., 2000).

A diminuição da migração de neutrófilos para o local da inflamação resulta de mudanças no padrão das citocinas anti e pró-inflamatórias. Entre os mediadores envolvidos na diminuição do recrutamento de neutrófilos, encontramos a IL-10, IL-4, IL-13 e lipoxinas. Ao termino do processo inflamatório, a remoção de neutrófilos dos tecidos ocorre através da apoptose e subsequente fagocitose dessas células por macrófagos (COLLINS, 2000; WITKO-SARSAT et al., 2000).

2.2 Indicações clínicas do hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio é um material amplamente empregado na odontologia, apresentando indicações clínicas diversas devido às suas propriedades favoráveis. Entre estas indicações podemos citar seu uso em casos de capeamento pulpar (EDA, 1961; MELLO et al., 1972; NEGM et al., 1981; DIAS et al., 1988; GIRO et al., 1991; SILVA et al., 1996; FARACO JÚNIOR e HOLLAND, 2001), em pulpotomias, já que promove a formação de uma ponte de tecido duro (HOLLAND et al., 1979; HOLLAND et al., 1981; Goldberg et al., 1984; Giro et al., 1991; ÇALISKAN, 1994) e em pulpectomias. Neste último caso, o hidróxido de cálcio pode ser empregado como curativo de demora (Heithersay, 1975;

HOLLAND et al., 1983; Leonardo et al., 1993; HOLLAND et al., 1998; Hosoya et al., 2001; Tanomaru Filho et al., 2002; Leonardo et al., 2002; HOLLAND et al., 2003) ou como material obturador (BINNIE; ROWE, 1973; HOLLAND et al., 1979; HOLLAND; SOUZA, 1985; WEISENSEEL et al., 1987; ALLARD et al., 1987; CROSHER et al., 1989; PANZARINI et al., 1998).

O hidróxido de cálcio é também um material freqüentemente empregado em casos de traumatismo dentário. Diversos estudos têm avaliado suas indicações em casos de avulsão e reimplante (BARKER; MYNE, 1975; TRONSTAD, 1981; GREGORIOU et al., 1994; TROPE et al., 1995; ÇALISKAN et al., 2000), fratura radicular (ÇALISKAN; TURKUN, 1996; SOUZA-NETO et al., 2000; GOMES et al., 2001; BLANCO; COHEN, 2002) e luxações (BARKER; MYNE, 1975; ÇALISKAN et al., 1998), demonstrando características satisfatórias no processo de reparo, quando do uso desse material.

Também é utilizado no tratamento de dentes permanentes jovens com necrose pulpar e ápice incompleto, buscando obter, nesses casos, o fechamento apical da raiz através da formação de uma barreira de tecido duro na região apical (CVEK, 1972; FERGUSON et al., 1980; GHOSE et al., 1987; KLEIER; BARR, 1991; MACKIE et al., 1994; GUPTA et al., 1999; KINIRONS et al., 2001), em tratamentos de Dens in dente (FERGUSON et al., 1980; VAJRABHAYA, 1989; HOLTZMAN; LEZION, 1996; AUGSBURGER E WONG, 1996; YEH et al., 1999) e em

casos de reabsorção ou perfuração radicular (TRONSTAD, 1981; MARTIN et al., 1982; SAAD, 1989; GREGORIOU et al., 1994; TROPE et al., 1995; COTTI et al., 1998; ÇALT et al., 1999; BENENATI, 2001).

No tratamento de dentes decíduos esse material também é bastante empregado, principalmente em casos de capeamento pulpar (JERREL et al., 1984; RANLY, GARCIA-GODOY, 1991; KOPEL, 1992), em pulpotomias (HEILIG et al., 1984; SCHRODER et al., 1987; RANLY, GARCIA-GODOY, 1991; RANLY, 1994; ROSENDAHL; WEINERT-GRODD, 1995; WALY, 1995), em pulpectomias (REYES; REINA, 1989; RANLY, GARCIA-GODOY, 1991; ROSENDAHL; WEINERT-GRODD, 1995; NURKO; GARCIA-GODOY, 1999; NURKO et al., 2000; NEDLEY, 2002) e em alguns casos de traumatismo dentário (FILIPPI et al., 1997; WEIGER; HEUCHERT, 1999; DE MORRE; DE WITTE, 2002).

2.2.1 Efeito mineralizador

Uma das características dos materiais a base de hidróxido de cálcio é que eles promovem a ativação enzimática tecidual, gerando um efeito mineralizador e favorecendo o processo de reparo dos tecidos. Portanto, o hidróxido de cálcio atua na formação de barreira de dentina (EDA, 1961; HOLLAND et al., 1981; HOLLAND et al., 1982; SCHRÖDER, 1985; ROSENDAHL; WEINERT-GRODD, 1995; SILVA et al., 1996; KITASSAKO et al., 2002), barreira osteocementária (BINNIE;

ROWE, 1973; HEITHERSAY, 1975; HOLLAND et al., 1978; HOLLAND et al., 1983; HOLLAND; SOUZA, 1985; ALLARD et al., 1987; YATES, 1988; TRONSTAD et al., 1988; LEONARDO et al., 1993; NELSON FILHO et al., 1999; DE MORRE; DE WITTE, 2002) e em outras áreas envolvidas em mineralizações (HOLLAND et al., 1982; SEUX et al., 1991; WAKABAYASHI et al., 1993; TZIAFAS; ECONOMIDES, 1999).

Quando aplicado sobre o tecido pulpar, o efeito inicial do hidróxido de cálcio é a formação de zonas de necrose, devido à injúria química causada pelos íons hidroxila. Essa injúria causa irritação dos tecidos, estimulando o processo de reparo através da proliferação vascular e da migração de células inflamatórias. Posteriormente, ocorre a migração e proliferação de células mesenquimais e endoteliais do tecido pulpar e a formação de colágeno. A mineralização do colágeno inicia-se com uma calcificação distrófica na zona de necrose e no tecido degenerado adjacente a ela. A presença de íons cálcio estimula a precipitação de carbonato de cálcio, iniciando o processo de mineralização (SCHRÖDER, 1985).

2.2.2. Efeito antimicrobiano

A ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio pode estar relacionada aos efeitos biológicos lesivos sobre a célula bacteriana, devido ao pH elevado. Como a localização dos sítios enzimáticos de

bactérias anaeróbias é na membrana citoplasmática, e por ser esta responsável por funções essenciais como metabolismo, crescimento e divisão celular, biossíntese de lipídeos, transporte de elétrons, acredita-se que os íons hidroxila do hidróxido de cálcio desenvolvam seu mecanismo de ação na membrana citoplasmática. O efeito do elevado pH desse material, devido à liberação de íons hidroxila, é capaz de alterar a integridade da membrana citoplasmática por meio de agressões químicas aos componentes orgânicos e transporte de nutrientes, ou através da destruição de fosfolipídios ou ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática (ESTRELA et al., 1994).

Os lipopolissacarídeos bacterianos possuem um papel importante no desenvolvimento da reabsorção óssea na região periapical. Porém, suas propriedades químicas são alteradas por tratamentos com substâncias alcalinas como, por exemplo, o hidróxido de cálcio (SAFAVI; NICHOLS, 1994). A explicação do mecanismo de ação do pH do hidróxido de cálcio no controle da atividade enzimática bacteriana, demonstrou a hipótese de uma inativação enzimática bacteriana irreversível, em condições extremas de pH, por longos períodos de tempo e uma inativação enzimática bacteriana temporária, quando do retorno do pH a um valor ideal à ação enzimática (ESTRELA et al., 1994).

Essa propriedade tem sido confirmada por diversos autores, já que o hidróxido de cálcio permite o desaparecimento progressivo de

bactérias nos canais radiculares, acelerando a reparação natural de lesões periapicais (QUACKENBUSH, 1986; CANALDA; PUMAROLA, 1989; SAFAVI; NICHOLS, 1994; ESTRELA et al., 1998; BEHNEN et al., 2001; SILVA et al., 2002). Dessa maneira, o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio tem sido amplamente avaliado, utilizando-se para isso preparações comerciais contendo esse material ou o hidróxido de cálcio em diferentes veículos (STEVENS; GROSSMAN, 1983; BYSTRÖM et al., 1985; QUACKENBUSH, 1986; CANALDA; PUMAROLA, 1989; ESTRELA et al., 1995; SIQUEIRA JÚNIOR; DE UZEDA, 1996; SIQUEIRA JÚNIOR; DE UZEDA, 1997; BARBOSA et al., 1997; GOMES et al., 2002; SUKAWAT; SRISUWAN, 2002; BARTHEL et al., 2002; MORRIE et al., 2003), podendo assim confirmar esta propriedade favorável deste material.

2.3 Propriedades gerais do hidróxido de cálcio

O hidróxido de cálcio constitui-se de um pó branco, alcalino (pH 12,8), pouco solúvel em água (solubilidade de 1,2 g/litro de água, à temperatura de 25°C). Trata-se de uma base forte obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio, até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva). Com a hidratação do óxido de cálcio chega-se ao hidróxido de cálcio. Dissocia-se em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que a ação destes íons sobre os tecidos e bactérias

permite destacar duas expressivas propriedades desta substância: a inativação de enzimas bacterianas conduzindo ao efeito antimicrobiano e a ativação enzimática tecidual, gerando o efeito mineralizador (BOWEN, 1964; GREENWOOD; EARNSHAW, 1984).

2.3.1 Dissociação iônica

As propriedades do hidróxido de cálcio estão relacionadas à sua dissociação em íons cálcio e hidroxila, os quais atuam sobre os tecidos e bactérias explicando as características biológicas e antimicrobianas desta substância. Essa dissociação ocorre apresentando uma porcentagem de íons hidroxila e íons cálcio que corresponde a 45,89% e 54,11%, respectivamente (ESTRELA; Pesce, 1996). Algumas características químicas decorrentes desta dissociação foram observadas em diferentes experimentos. Os íons cálcio presentes na ponte dentinária, não foram observados quando da proteção de polpas dentais expostas de cães com hidróxido de cálcio contendo cálcio radioativo (Ca^{45}), nem quando feita a injeção intravenosa, de uma solução contendo este mesmo hidróxido de cálcio radioativo, em cães (SCIAKY; PISANTI, 1960; PISANTI; SCIAKY, 1964). Entretanto, diversos trabalhos demonstraram a participação dos íons cálcio do hidróxido de cálcio em mineralizações dentinárias, osteocementárias e em outras áreas envolvidas em mineralizações (EDA, 1961; HOLLAND,

1971; HEITHERSAY, 1975; HOLLAND et al., 1978; HOLLAND et al., 1982; PASHLEY et al., 1986; SEUX et al., 1991; WAKABAYASHI et al., 1993).

Algumas alterações nessas propriedades biológicas podem estar relacionadas ao fato de que o hidróxido de cálcio na presença de dióxido de carbono transforma-se em carbonato de cálcio apresentando características químicas de um óxido ácido fraco. Este produto formado é desprovido das propriedades biológicas do hidróxido de cálcio, como a capacidade mineralizadora (ESTRELA; PESCE, 1996; ESTRELA et al., 1997). Em canais obturados com hidróxido de cálcio e óxido de cálcio, ocorreu uma diminuição do pH, após a exposição ao CO₂. A conversão do óxido de cálcio em carbonato de cálcio na presença do CO₂ pode reduzir a capacidade de difusão dos íons hidroxila. Embora não tenha ocorrido uma diminuição significativa de pH in vitro, este fato pode ocorrer in vivo, devido à presença do CO₂ resultante da degradação de tecidos necróticos (MIÑANA et al., 2001).

2.3.2 Variações de pH

A variação do pH pode refletir no crescimento bacteriano, já que influencia a atividade enzimática desses microorganismos. Portanto, é de fundamental importância conhecer o efeito do pH sobre o

crescimento, o metabolismo e a divisão bacteriana. Para que possa exercer uma ação adequada, o pH do hidróxido de cálcio deve se manter o mais elevado possível. A variação do pH está relacionado ao veículo ao qual é adicionado. Portanto, alguns trabalhos utilizam a aplicação direta de materiais contendo hidróxido de cálcio (bases e cimentos), outros utilizam o hidróxido de cálcio em diferentes veículos como água destilada, solução anestésica, glicerina, polietilenoglicol, paramonoclorofenol, dentre outros.

Alguns materiais a base de hidróxido de cálcio como o Nu-Cap, Dycal, Life, Neodyne- α e Nobudyne, quando em contato com a dentina, apresentaram um pH praticamente neutro (IDA et al., 1989). Entretanto, o hidróxido de cálcio associado à água destilada, monoclórofenol canforado ou a pasta Pulpdent, quando em contato com a dentina, demonstraram um rápido aumento inicial do pH nos três primeiros dias (pH 9,5), decaindo após 18 dias (pH 9,0) e estabilizando ao final de 120 dias (pH 10), indicando que os íons hidroxila provenientes desses materiais se difundiram através da dentina, mantendo o pH alto pelo período de 120 dias (ESBERARD et al., 1996). Resultados semelhantes foram observados, quando do uso da água destilada como veículo, apresentando aumento de pH no terceiro dia e uma mudança nesse pico após 14 dias (HOSOYA et al., 2001).

Em um estudo avaliando o pH dos cimentos endodônticos a base de hidróxido de cálcio Sealer 26, Apexit, CRCS e Sealapex foi possível observar que todos os cimentos testados apresentaram pH alcalino (FIDEL et al., 1995). Ao contrário, algumas pastas a base de hidróxido de cálcio (DT temporary Dressing, hidróxido de cálcio e solução salina e TempCanal) demonstraram uma liberação e difusão gradual de cálcio através de estrutura dentinária, sem, entretanto, induzir um aumento no pH do meio externo (ÇALT et al., 1999).

O cimento a base de hidróxido de cálcio Sealapex apresentou uma maior liberação de íons cálcio e hidroxila, especialmente após longos intervalos de tempo quando comparado ao Sealer 26, que mostrou uma maior liberação de íons durante os períodos iniciais, e ao cimento Apexit, que apresentou os resultados menos satisfatórios (DUARTE et al., 2000).

Observando-se a associação do hidróxido de cálcio com diferentes veículos, foi possível constatar que a solução aquosa permite um aumento rápido e prolongado da alcalinidade nos túbulos da dentina radicular, demonstrando ser mais efetiva como medicação intracanal do que os cones de guta-percha contendo hidróxido de cálcio (SCHÄFER; AL BEHAISSI, 2000, PÉREZ et al., 2000, PÉREZ et al., 2001; HO et al., 2003), já que a permanência desses cones no interior do canal por períodos superiores há uma semana pode ser ineficaz (AZABAL-ARROYO et al., 2002, ARDESHNA et al., 2002, HO et al., 2003). A

concentração de cálcio e os valores de pH também são maiores quando este material é utilizado associado à água destilada do que quando utilizado na forma de pó (HOSOYA et al., 2001).

O uso de soluções anestésicas associadas ao hidróxido de cálcio demonstrou um pH inicial mais baixo, aumentando após uma semana, período no qual os valores se mantiveram semelhantes às formulações utilizando água destilada e solução salina (SOLAK; ÖZTAN, 2003).

Quando associado à glicerina, o hidróxido de cálcio apresentou um pH mais elevado do que quando utilizado somente com água destilada, em períodos de 1, 4, 7 e 12 dias, indicando que o uso desse material pode ser associado aos dois veículos e não somente a água destilada (ALAÇAM et al., 1998). Entretanto, o uso da glicerina e do polietilenoglicol associados ao hidróxido de cálcio podem ocasionar um aumento da acidificação, em intervalos entre o preenchimento do canal e após 14 dias (CAMÕES et al., 2003).

2.3.3 Uso de diferentes veículos

É de extrema importância que a medicação intracanal penetre nos túbulos e ramificações dentinárias, para que possa alcançar e combater os microorganismos ali presentes. A hidrossolubilidade ou não do veículo, suas características ácido-base, a maior ou menor penetração dentinária e o grau de calcificação presente, podem

influenciar a velocidade de dissociação e difusão dos íons do hidróxido de cálcio (ESTRELA; BAMMAN, 1999). A análise química de pastas de hidróxido de cálcio, frente à liberação de íons cálcio e íons hidroxila demonstrou que o veículo acrescido ao hidróxido de cálcio pré-análise para a confecção da pasta influencia na velocidade de dissociação iônica, nas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, na ação antimicrobiana e mineralizadora. A velocidade de dissociação iônica, também é influenciada pela diferença de viscosidade dos veículos empregados, sua hidrossolubilidade ou não, e pela proporção pó-líquido das pastas (ESTRELA; PESCE, 1996).

Por ser fundamental a utilização do veículo adequado, diversos estudos foram realizados, buscando conhecer as propriedades desses materiais, isoladamente, ou quando associados ao hidróxido de cálcio (ANTHONY et al., 1982; SIQUEIRA JÚNIOR; DE UZEDA, 1996; SIQUEIRA JÚNIOR; DE UZEDA, 1997; SAFAVI; NAKAYAMA, 2000; OZCELIK et al., 2000; ESTRELA et al., 2001; SUKAWAT; SRISUWAN, 2002; GOMES et al., 2002; ESTRELA et al., 2002; CAMÕES et al., 2003; LYNNE et al., 2003; SOLAK; ÖZTAN, 2003).

O uso do paramonoclorofenol como veículo se mostrou mais eficiente na eliminação de bactérias dos túbulos dentinários do que a solução salina, sem interferir nas propriedades biológicas do hidróxido de cálcio (SIQUEIRA JÚNIOR; DE UZEDA, 1996). Quando comparado ao uso da água destilada ou da glicerina como veículos, o

paramonoclorofenol canforado também se mostrou mais eficiente quanto ao seu efeito antimicrobiano, em teste de difusão em ágar (SIQUEIRA JÚNIOR; DE UZEDA, 1997). Resultados semelhantes também foram observados com uso da água destilada, clorexidina 0,2% e paramonoclorofenol canforado associados ao hidróxido de cálcio, onde a preparação utilizando o paramonoclorofenol canforado foi mais eficiente para eliminar as bactérias presentes no interior dos canalículos dentinários (SUKAWAT; SRISUWAN, 2002).

A combinação do hidróxido de cálcio com o paramonoclorofenol canforado e glicerina mostrou uma significativa área de inibição do crescimento bacteriano, em meio de cultura, quando comparada ao uso desses materiais isoladamente, ou ao uso da água destilada, solução salina, solução anestesia (carbocáína 3%) e polietilenoglicol (GOMES et al., 2002).

O uso da água destilada como veículo na preparação do curativo de hidróxido de cálcio, favorece a dissociação desse material em íons cálcio e hidroxila, apresentando uma adequada ação antimicrobiana. Ao contrário, o uso de soluções não aquosas como a glicerina, podem diminuir a efetividade do hidróxido de cálcio como medicação intracanal (SAFAVI; NAKAYAMA, 2000). Os veículos polietilenoglicol, glicerina, paramonoclorofenol canforado e associação entre glicerina e formocresol associados ao hidróxido de cálcio, apresentaram, quando no interior do canal radicular, uma tendência a acidificação do meio

externo durante os 8 primeiros dias. Os valores de pH retornaram a níveis semelhantes ao encontrado com o uso da solução salina e de solução anestésica, após 42 dias (CAMÕES et al., 2003).

O uso de diferentes veículos (solução salina, paramonoclorofenol canforado, solução de clorexidina a 1%, lauril sulfato de sódio 3% e Otosporin) associados ao hidróxido de cálcio, não influenciou o tempo requerido para a inativação de diferentes suspensões bacterianas através de contato direto (ESTRELA et al., 2001). Esses mesmos resultados foram observados comparando-se a solução salina, polietilenoglicol e paramonoclorofenol canforado associados ao hidróxido de cálcio, utilizando teste de exposição direta e o teste de difusão em ágar (ESTRELA et al., 2001).

O uso do hidróxido de cálcio associado à água destilada, clorexidina a 0,12% (Peridex) ou 10% dessa solução demonstraram uma ação antimicrobiana efetiva sobre o *Enterococcus faecalis* presente em túbulos dentinários, sendo que a associação com água destilada apresentou uma ação mais efetiva na eliminação desse microorganismo dos túbulos dentinários (LYNNE et al., 2003).

O uso de soluções anestésicas associadas ao hidróxido de cálcio demonstrou um pH inicial mais baixo, aumentando após uma semana, período no qual os valores se mantiveram semelhantes às formulações utilizando água destilada e solução salina (SOLAK; ÖZTAN, 2003).

Ao considerar a necessidade de penetração das substâncias químicas no interior dos túbulos dentinários e nas ramificações dentinárias, para que estas atuem sobre os microorganismos presentes no canal radicular, os estudos sobre a tensão superficial das formulações de hidróxido de cálcio em diferentes veículos se tornam fundamentais. O uso de solução anestesia (Citanest-Octapressin 3%) associada ao hidróxido de cálcio apresentou resultados mais favoráveis quanto à tensão superficial, quando comparada ao uso da solução de Ringer e solução salina (OZCELIK et al., 2000). Entretanto, o uso dessas soluções como veículo demonstrou um pH inicial mais baixo, aumentando após uma semana, se mantendo nesse período semelhante às formulações utilizando água destilada e solução salina (SOLAK; ÖZTAN, 2003).

A comparação das propriedades de diferentes veículos associados ou não ao hidróxido de cálcio, demonstraram que os valores mais altos quanto à tensão superficial foram observados para a água destilada, seguido pela clorexidina, paramonoclorofenol com furacin, paramonoclorofenol canforado, Otosporin e Lauril dietileno éter sulfato de sódio a 3%. Entretanto, é importante lembrar que o fato de uma substância apresentar uma baixa tensão superficial não significa que ela possua propriedades antimicrobianas adequadas (ESTRELA et al., 2002).

2.4 Processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio

Muitos estudos têm avaliado a biocompatibilidade de materiais contendo hidróxido de cálcio sobre tecido subcutâneo (ECONOMIDES et al., 1995; SILVA et al., 1997), tecido pulpar (NEGM et al., 1981; SCHRÖDER, 1985; AEINEHCHI et al., 2003), tecido periapical (BINNIE; ROWE, 1973; HOLLAND et al., 1978; HOLLAND; SOUZA, 1985; NELSON FILHO et al., 1999; DE MORRE; DE WITTE, 2002), sobre células (SAFAVI; NICHOLS, 1994; SILVA et al., 1995; SEGURA et al., 1997; WILLERSHAUSEN et al., 2000; LEONARDO et al., 2000).

Quando aplicado sobre o tecido pulpar, o hidróxido de cálcio, induz, inicialmente, a formação de uma zona de necrose, devido à injúria química ocasionada pelos íons hidroxila, estimulando assim, o processo de reparo (SCHRÖDER, 1985).

Quando avaliada sua ação sobre o tecido pulpar, utilizando-se para isso polpas de dente bovino extraídas e tratadas com soluções de hidróxido de cálcio, variando o pH, a concentração ou utilizando hidróxido de bário, os resultados sugeriram que os efeitos do hidróxido de cálcio dependem do seu pH e que sua eficácia pode ser resultado de sua baixa solubilidade e, portanto, toxicidade, quando comparado a sais de cátions divalentes, como o hidróxido de bário (GORDON et al., 1985).

A resposta inflamatória induzida por materiais à base de hidróxido de cálcio é caracterizada inicialmente por um processo inflamatório variando entre moderado a severo, com uma grande quantidade de células inflamatórias (HOLLAND et al., 1978; SILVA et al., 1997, ECONOMIDES et al., 1995).

Quando associado à água destilada, em pulpectomias, se caracterizou em sua fase inicial, 2 a 7 dias, pela deposição de grânulos de sais de cálcio, proliferação celular e pela presença de células inflamatórias (HOLLAND et al., 1978). Os cimentos Roth811 e Sealapex apresentaram inicialmente, um processo inflamatório de moderado a severo, quando implantados em tecido subcutâneo de ratos, enquanto o CRCS apresentou uma inflamação de grau leve a moderado (ECONOMIDES et al., 1995). Resultados semelhantes foram observados quando uma intensa neutrofilia inicial foi verificada após a implantação de cimentos a base de hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26), no tecido subcutâneo de camundongos. Com o cimento Sealapex, a fase intermediária do processo inflamatório foi marcada pela presença de células do sistema fagocitário mononuclear, como macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas. Essa resposta foi menos intensa com o uso dos cimentos CRCS e Apexit. Uma intensa migração de leucócitos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal de camundongos foi observada, após 6 e 24 horas da injeção de suspensões desses

cimentos. Um aumento na quantidade de células mononucleares foi observado após 6, 24 horas e 5 dias (SILVA et al., 1997).

Essa resposta tecidual inicial costuma ser seguida pela diminuição da migração de células inflamatórias associada à indução do processo de reparo (HOLLAND et al., 1978; NEGM et al., 1981; HOLLAND; SOUZA, 1985; NELSON FILHO et al., 1999; DE MORRE; DE WITTE, 2002).

O uso do hidróxido de cálcio associado à água destilada em pulpectomias demonstrou uma diminuição na quantidade de células inflamatórias e aposição de cimento na região periapical, após 15 a 30 dias. Aos 120 dias, os resultados se apresentavam semelhantes aos períodos entre 15 e 60 dias, sendo observada uma maior aposição de cimento, demonstrando que o hidróxido de cálcio em pulpectomias permite um alto índice de selamento biológico (HOLLAND et al., 1978).

O uso do cimento Dycal demonstrou uma diminuição da reação inflamatória, ocorrendo posteriormente a formação de dentina, quando utilizado no capeamento pulpar (NEGM et al., 1981). O uso da pasta de Calen induziu uma resposta inflamatória inicial leve nos tecidos periapicais, enquanto a associação desta ao paramonoclorofenol canforado ou o uso da pasta Calasept, produziram extensas respostas inflamatórias. Entretanto, embora o uso de pastas contendo hidróxido de cálcio tenha ocasionado uma resposta inflamatória inicial sobre os

tecidos, foi possível observar o processo de reparo com o uso desses materiais (NELSON FILHO et al., 1999).

O cimento Sealapex e o hidróxido de cálcio associado à água destilada quando extravasados para a região periapical provocaram uma reação inflamatória crônica no ligamento periodontal, sendo que o Sealapex, muitas vezes, estimulou a deposição de um tecido mineralizado nessa área ou foi facilmente reabsorvido (HOLLAND; SOUZA, 1985). Resultados semelhantes foram observados em outro estudo onde apesar da alta alcalinidade do hidróxido de cálcio, a sobreextensão do material para a região perirradicular resultou em reações teciduais transitórias, sendo observado o reparo adequado dos tecidos periapicais, em dentes decíduos apresentando casos de trauma ou necrose pulpar (DE MORRE; DE WITTE, 2002).

Entretanto, alguns estudos observaram efeitos agressivos de materiais a base de hidróxido de cálcio sobre os tecidos. O cimento a base de hidróxido de cálcio Sealapex apresentou uma reação inflamatória inicial, quando implantado em tecido subcutâneo de camundongos, persistindo uma reação mononuclear difusa e reações focais de corpo estranho aos 60 dias (BIRMAN et al., 1990).

O uso de materiais a base de hidróxido de cálcio (Endodent), e pastas de óxido de zinco e eugenol contendo formocresol (Odahcan) e glutaraldeído (Inodon), foram agressivos aos tecidos pulpares, provocando diversas alterações teciduais, como, necrose de

coagulação, inflamação aguda e crônica de variadas intensidades e áreas de reabsorção interna e externa. (GIRO et al., 1991). Outros materiais a base de hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS e Apexit) também foram considerados citotóxicos ocasionando uma diminuição na quantidade de fibroblastos, em um estudo in vitro (SILVA et al., 1995).

Um infiltrado inflamatório e uma área de necrose tecidual também foram observados em tecido pulpar de ratos, quando capeados com hidróxido de cálcio associado à solução fisiológica ou à água destilada. Aos 7 dias a área de necrose se localizava à superfície da polpa coronária, sendo observado posteriormente um aumento do processo de necrose. Aos 60 dias, havia ocorrido o envolvimento de todo o tecido pulpar no processo de necrose tecidual (SILVA et al., 1996).

O uso do hidróxido de cálcio foi comparado a outros materiais utilizados no tratamento endodôntico, empregando-se variadas metodologias. Quando utilizado no capeamento pulpar o hidróxido de cálcio apresentou, após 30 dias, ausência de inflamação no tecido pulpar enquanto o óxido de zinco e eugenol, preparado em diferentes consistências, demonstrou a presença de um infiltrado inflamatório variado e ausência de reparo (MELLO et al., 1972).

Quando utilizada como material obturador, a pasta de hidróxido de cálcio associada água destilada apresentou resultados mais satisfatórios do que a pasta de Grossman ou o Calxyl, demonstrando ausência de inflamação moderada ou severa nos tecidos periapicais que

estavam em contato direto com esse material (BINNIE; ROWE, 1973). Entretanto, quando comparado ao uso do MTA para o capeamento pulpar, o uso de um cimento a base de hidróxido de cálcio (Dycal) apresentou resultados menos satisfatórios, sendo observada uma resposta inflamatória e em alguns casos, apresentando um grande número de neutrófilos após 2 meses (FARACO JÚNIOR; HOLLAND, 2001). Resultados semelhantes foram observados após uma semana, 2, 3 4, e 6 meses, em terceiros molares humanos capeados com o MTA, os quais apresentaram uma resposta inflamatória mais leve, quando comparados com o hidróxido de cálcio (AEINEHCHI et al., 2003).

2.4.1 Efeito do hidróxido de cálcio sobre células

Diversos estudos avaliaram a ação do hidróxido de cálcio sobre culturas de diferentes tipos celulares (SAFAVI; NICHOLS, 1994; SILVA et al., 1995; SEGURA et al., 1997; WILLERSHAUSEN et al., 2000; LEONARDO et al., 2000). Alterações das propriedades biológicas de lipopolissacarídeos bacterianos foram observadas, após o tratamento com hidróxido de cálcio. Culturas de monócitos foram estimuladas com lipopolissacarídeos bacterianos ou LPS tratados com hidróxido de cálcio, sendo analisadas em relação ao conteúdo de prostaglandinas E2 através de espectrofotometria de massa para gás cromatográfico. A prostaglandina E2 foi identificada em monócitos expostos ao LPS, mas

não naqueles estimulados com LPS tratados com hidróxido de cálcio, permitindo a conclusão de que o tratamento com hidróxido de cálcio pode alterar as propriedades biológicas do LPS bacteriano (SAFAVI; NICHOLS, 1994).

O uso dos cimentos a base de hidróxido de cálcio Sealapex, CRCS e Apexit, demonstram que esses materiais foram considerados citotóxicos sobre fibroblastos. O Sealapex mostrou a maior citotoxicidade ocasionando uma diminuição na quantidade dessas células, enquanto o cimento menos tóxico foi o Apexit (SILVA et al., 1995). Os materiais endodônticos Sealapex, Super-EBA, Ketak-Endo, AH-Plus e cones de guta percha contendo hidróxido de cálcio também reduziram o conteúdo de proteínas de fibroblastos nasais, gengivais e células epiteliais tumorais. O crescimento, a morfologia e a viabilidade celular também foram alterados, variando com os materiais testados. Não foram observados aumentos na liberação de PGE_2 com os cimentos Sealapex e Super-EBA, ao contrário do que ocorreu com os cimentos Ketak-Endo, AH-Plus e com os cones de guta-percha (WILLERSHAUSEN et al., 2000).

O hidróxido de cálcio também pode atuar inibindo a capacidade de aderência dos macrófagos e alterando as funções dessas células, já que a capacidade de aderência é fundamental para o processo de fagocitose e apresentação de antígenos. Atua reduzindo a resposta inflamatória nos tecidos periapicais e na polpa quando utilizado em

pulpectomias e pulpotomias, respectivamente. Esse efeito poderia explicar, pelo menos em parte, a propriedade do hidróxido de cálcio em induzir a formação de tecido mineralizado, já que osteoclastos e dentinoclastos derivados de macrófagos poderiam ter suas funções diminuídas devido à presença desse material (SEGURA et al., 1997).

Os cimentos Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26 foram comparados a uma base de óxido de zinco e eugenol (Fill Canal), quanto a mudanças morfológicas em culturas de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos. O material menos citotóxico foi o Fill Canal, seguido pelo CRCS, Sealer 26, Apexit e Sealapex. O Sealapex ocasionou um grande halo de citólise, onde os macrófagos sofrem lise após entrarem em contato com o material, permanecendo no local remanescentes de membrana, citoplasma e núcleo (LEONARDO et al., 2000).

3 *Proposição*

O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos na migração celular para bolha de ar subcutânea em camundongos induzida pelo hidróxido de cálcio. Para isso, avaliamos:

- ✓ A padronização das condições de migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea, em camundongos.
- ✓ Os mediadores inflamatórios envolvidos na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para a bolha de ar subcutânea.
- ✓ A participação das células residentes na migração induzida pelo hidróxido de cálcio para a bolha de ar subcutânea.

4 Material e Método

Previamente à realização deste estudo, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, para apreciação, o qual foi aprovado (Protocolo 52/03 – 11/08/2003). (Anexo A)

4.1 Animais

Para o estudo foram utilizados grupos experimentais com 06 camundongos balb/c machos, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, cujas matrizes foram cedidas pelo Biotério da Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os camundongos possuíam, em média, 3 meses de idade, pesando de 18 a 20 gramas.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24° C com ciclo de luz controlada (doze horas claro e doze horas escuro) e em gaiolas coletivas, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad Libitum”

4.2 Procedimento experimental.

4.2.1 Migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio

No primeiro dia do experimento, foi realizada a tricotomia da região dorsal e a injeção de ar para criação da bolsa subcutânea. Para isso, os animais foram anestesiados com xilazina (25mg/kg) + quetamina (50mg/kg). O dorso de cada animal recebeu anti-sepsia com tintura de iodo a 2% antes e após a realização da tricotomia da região. Posteriormente, foram criadas bolsas de ar subcutâneas, através da injeção de 5ml de ar estéril na região dorsal obtido de um fluxo laminar (VLFS12 – VECO – Campinas) (Figuras 1 e 2).



FIGURA 1-	Obtenção de ar estéril de fluxo laminar.
-----------	--



FIGURA 2-	Injeção do ar estéril no tecido subcutâneo.
-----------	---

No quarto dia do experimento, após a anestesia e antissepsia da região dorsal do animal, foi realizada a manutenção da bolsa através da injeção de mais 4 ml de ar estéril (Figura 3). Sete dias após, 0,3ml de

uma suspensão de hidróxido de cálcio, previamente esterilizada, foi injetada na bolha de ar subcutânea, servindo como estímulo para indução da resposta inflamatória. A suspensão consistia de hidróxido de cálcio P. A. (Biodinâmica, PR, Brazil) e água destilada (Figura 4). Como controle, utilizou-se a injeção de 0,3 ml de PBS (Anexo B).



FIGURA 3-

Bolha de ar subcutânea.



FIGURA 4-

Injeção do estímulo.

4.2.1.1 Determinação da concentração-efeito

Foram utilizadas diferentes concentrações de hidróxido de cálcio com o objetivo de determinar o padrão de migração celular envolvido na resposta inflamatória induzida pelo hidróxido de cálcio, a saber:

- 50 mg/ml;
- 100 mg/ml;
- 500 mg/ml;
- 1000 mg/ml

Após o período de 48 horas, os animais foram sacrificados através de uma sobredose anestésica com éter etílico, para realizar a lavagem da cavidade e a obtenção das células para a contagem global e diferencial. Para a lavagem da cavidade, foram injetados 4 ml de PBS contendo heparina sódica (Liquemine, Roche - 10 UI/ml), sendo feita uma leve pressão digital para permitir a difusão adequada da solução (Figura 5). Posteriormente, foi realizada uma incisão na região dorsal para permitir o acesso à cavidade e a coleta do exsudato (Figuras 6 e 7).

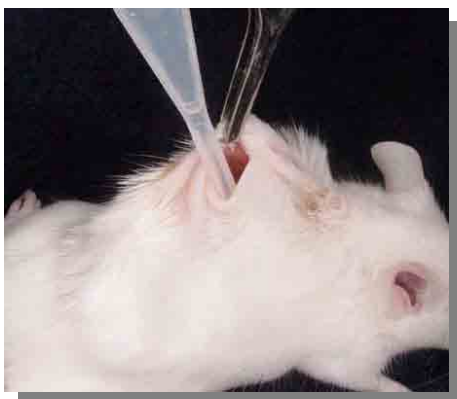


FIGURA 5-	Pressão digital para difusão do PBS.
-----------	--------------------------------------



FIGURA 6-	Incisão para acessar a bolha de ar subcutânea.
-----------	--

O lavado obtido de cada animal foi armazenado em tubos previamente identificados, para a realização da contagem global e diferencial das células inflamatórias (Figura 8).



Teste Tempo Resposta

FIGURA 7-	Obtenção do lavado da bolha de ar subcutânea.
-----------	---



FIGURA 8-	Tubos identificados contendo o lavado.
-----------	--

4.2.1.2 Determinação do tempo-resposta

Para determinação do tempo de pico de migração de neutrófilos, utilizou-se a dose de 500 mg/ml, obtida a partir da curva da Concentração-efeito. O Tempo-Resposta da migração de neutrófilos foi avaliado 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção do estímulo.

Nos tempos definidos, os animais foram sacrificados da mesma maneira que da curva Concentração-efeito. Os lavados obtidos foram armazenados em tubos previamente identificados, para a realização da contagem global e diferencial das células inflamatórias.

4.2.2 Contagem global

Para realização da contagem global, foram utilizadas alíquotas de 20 µl do lavado obtido da bolsa de ar, diluído em 380 µl de líquido de Turk, na proporção de 1:20 (Figura 9). A contagem global foi efetuada utilizando a Câmara de Neubauer (Figura 10), com auxílio de microscópio óptico em aumento de 40X e contador manual, observando-se a presença de células inflamatórias, sem, entretanto, diferenciá-las. A partir dos resultados obtidos nessa contagem, foi calculado o número total de células em cada cavidade.



FIGURA 9-	Diluição em líquido de Turk.
-----------	------------------------------

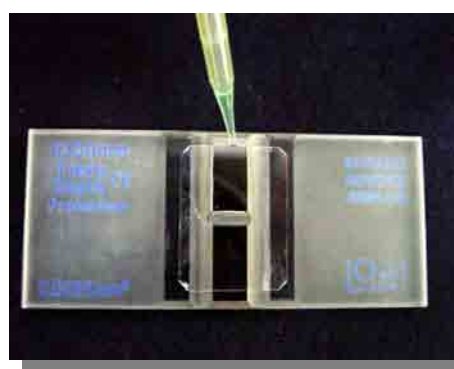


FIGURA 10	Câmara de Neubauer.
-----------	---------------------

4.2.3 Contagem diferencial

Para a realização da contagem diferencial, o restante do lavado obtido de cada animal foi centrifugado a 1200 rpm, durante 5 minutos (Figura 11). Após o descarte do sobrenadante, as células foram

ressuspendidas com 200µl de BSA a 0,3%, preparado em PBS (Figura 12). As lâminas foram preparadas com a adaptação de um papel filtro contendo duas perfurações à superfície da lâmina e estabilização com fita adesiva Durex (3M do Brasil S.A.). As perfurações no papel filtro foram feitas com um perfurador de 5mm para padronização das áreas a serem analisadas. As células, depois de ressuspendidas, foram depositadas nas áreas perfuradas (Figura 13).



FIGURA 11	Centrifugação do exsudato.
-----------	----------------------------



FIGURA 12	Descarte do sobrenadante.
-----------	---------------------------

As lâminas permaneceram secando, em temperatura ambiente, por 24 horas, sendo coradas pelo método de Diff Quik. Através desse métodos, as lâminas são submetidas à ação de um fixador (triarilmetano a 0,1%) e duas soluções corantes (xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%), encontrando-se pronta para leitura imediatamente ao final da ultima imersão (Figura 14).

As células foram examinadas em microscópio óptico através de imersão em óleo com objetiva de 100x de aumento. Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-se três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares (macrófagos e linfócitos), sendo encontrada, assim, a porcentagem de cada tipo celular.

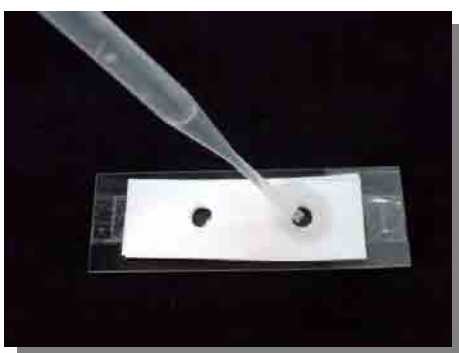


FIGURA 13	Preparação das lâminas para contagem diferencial.
-----------	---



FIGURA 14	Coloração das lâminas.
-----------	------------------------

4.2.4 Efeito do pré-tratamento com diferentes drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos

Para a identificação dos possíveis mediadores químicos envolvidos nesse processo inflamatório, foi observado o efeito do pré-tratamento com as seguintes drogas (RIBEIRO et al., 1997; Oliveira, 1998):

Tabela 1 – Pré-medicação com diferentes drogas antiinflamatórias.

DROGA	FABRICANTE	AÇÃO	DOSE	VIA
Dexametasona	Sigma Chem.	Glicocorticóide	1 mg/Kg	S. C
Indometacina	Sigma Chem.	Inibidor da ciclooxigenase	5 mg/Kg	S.C
Meloxicam	Merck - Brasil	Inibidor da Ciclooxigenase 2	5 mg/Kg	V.O.
MK 886	Calbiochem	Inibidor da 5- lipoxigenase	1 mg/Kg	V.O.

O veículo utilizado para a administração das drogas foi o PBS, sendo a Indometacina diluída em TRIS. As drogas foram administradas no sétimo dia do experimento, ou seja, após o estabelecimento das bolsas de ar subcutâneas, meia hora antes da injeção do estímulo. Exceção foi feita para a dexametasona que foi administrada uma hora antes da injeção do estímulo. Todas as drogas foram administradas, após a estimulação, a cada 24 horas até que se completassem os períodos pré-determinados para o sacrifício dos animais (referente ao Teste Tempo/Resposta). A lavagem da bolha de ar para a coleta do exsudato e as contagens global e diferencial foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos inicialmente.

4.2.5 Aumento da população de macrófagos com tioglicolato a 3%

Para avaliação do papel das células residentes na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio, as cavidades foram pré-estimuladas com 0,5ml de Tioglicolato 3%, três dias antes da injeção do estímulo, para induzir um aumento da população de macrófagos. Foi realizada então a injeção dos estímulos, sendo o hidróxido de cálcio (500mg/ml), o fMLP (10 nmol/cavidade) e o LTB₄ (10 nmol/cavidade) (Ribeiro, 1997). Após o período experimental (relacionado ao Teste Tempo/Resposta), os animais foram sacrificados, sendo realizados os mesmos procedimentos para contagem global e diferencial das células inflamatórias.

4.2.6 Determinação da produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 no exsudato da bolha de ar subcutânea de camundongos estimulados por hidróxido de cálcio

ELISA: A produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 extracelular foram quantificadas utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com anticorpos anti-quimiocinas ou anti-citocinas, diluídos em tampão

fosfato de cálcio, durante 15-18 h a 4°C. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, contendo 0,5% de Tween 20 e bloqueadores durante 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS contendo 1% de BSA. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com os sobrenadantes da células ou com quimiocinas ou citocinas recombinantes durante 1 hora a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo biotinilado por 30 minutos à 37°C. As placas foram, então, lavadas e o substrato adicionado. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm.

4.3 *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 3.0. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida do teste de correção de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 Resultados

5.1 Avaliação da migração de células para bolha de ar subcutânea induzida por diferentes concentrações de hidróxido de cálcio

A migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio injetado na bolha de ar subcutânea, em camundongos, ocorreu de maneira dose-dependente, quando comparada com o grupo controle (Figura 15). Observamos que as doses de 100 e 500 mg/ml induziram migração de neutrófilos estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo controle. Pudemos notar ainda, um pequeno recrutamento de células mononucleares. No entanto, essa migração não foi estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo controle. O acúmulo de eosinófilos foi praticamente inexistente neste modelo experimental.

Em relação à cinética de migração, observamos que a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio (500mg/ml) para a bolha de ar subcutânea, alcançou níveis significativos 48 horas após a injeção do estímulo, quando comparada ao grupo controle (PBS), alcançando níveis elevados 96 horas após a injeção do estímulo, ocorrendo uma

diminuição dessa migração após 120 horas (Figura 16). Desse modo, nos demais experimentos, a dose de hidróxido de cálcio utilizada para avaliar a migração de neutrófilos foi de 500mg/ml, avaliada no tempo de 96 horas após a injeção do estímulo.

Por outro lado, observamos que o pico de migração de células mononucleares ocorreu 120 horas após a injeção do estímulo. Entretanto, nesse mesmo período, ainda pudemos observar migração de neutrófilos para a bolha de ar, migração esta semelhante à observada para as células mononucleares (Figura 17).

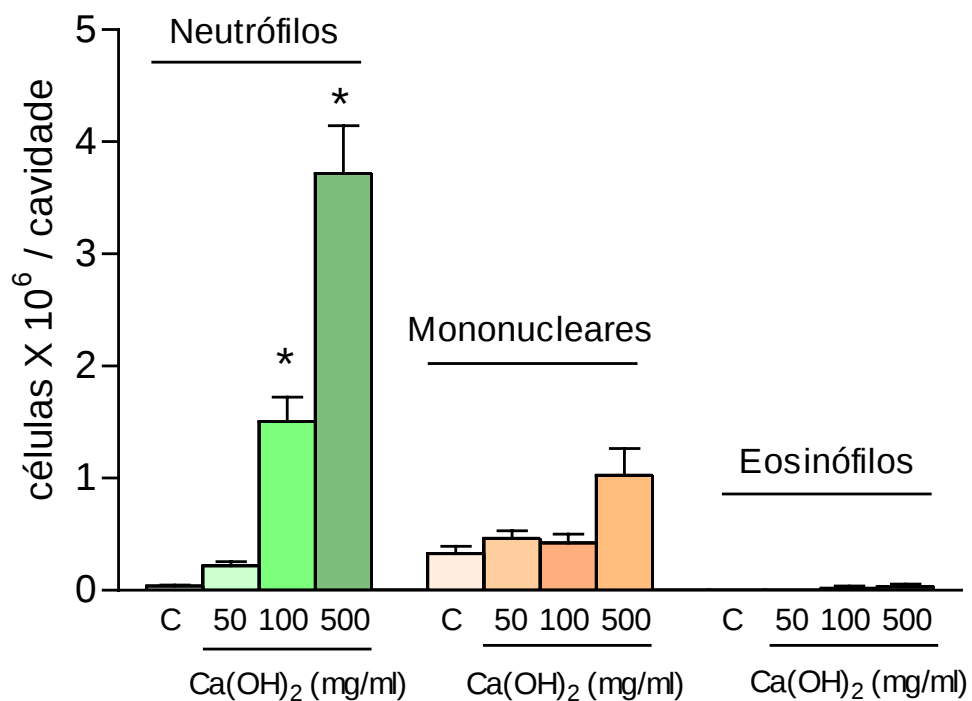


FIGURA 15 Concentração-efeito da migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio.

A migração de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos para a bolha de ar subcutânea foi induzida pelo hidróxido de cálcio nas concentrações de 50, 100 e 500 mg/ml. A migração celular foi avaliada 48 horas após a administração do estímulo. (C) - Grupo Controle. As barras representam a média $\pm$ EPM três experimentos (em relação ao Grupo Controle). * $p < 0,05$ (ANOVA com correção de Bonferroni).

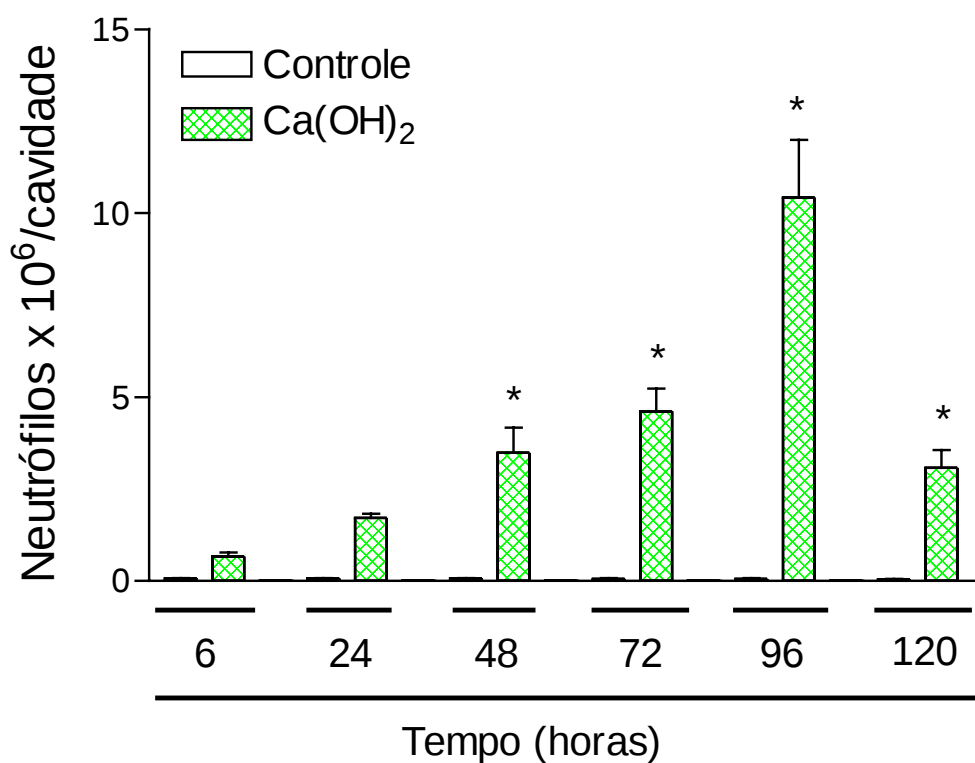


FIGURA 16 Tempo-resposta da migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio.

A migração de neutrófilos, induzida pelo hidróxido de cálcio (500mg/ml), para a bolha de ar foi avaliada 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção do estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de três experimentos. * $p < 0,05$ (em relação ao Grupo Controle) (ANOVA com correção de Bonferroni)

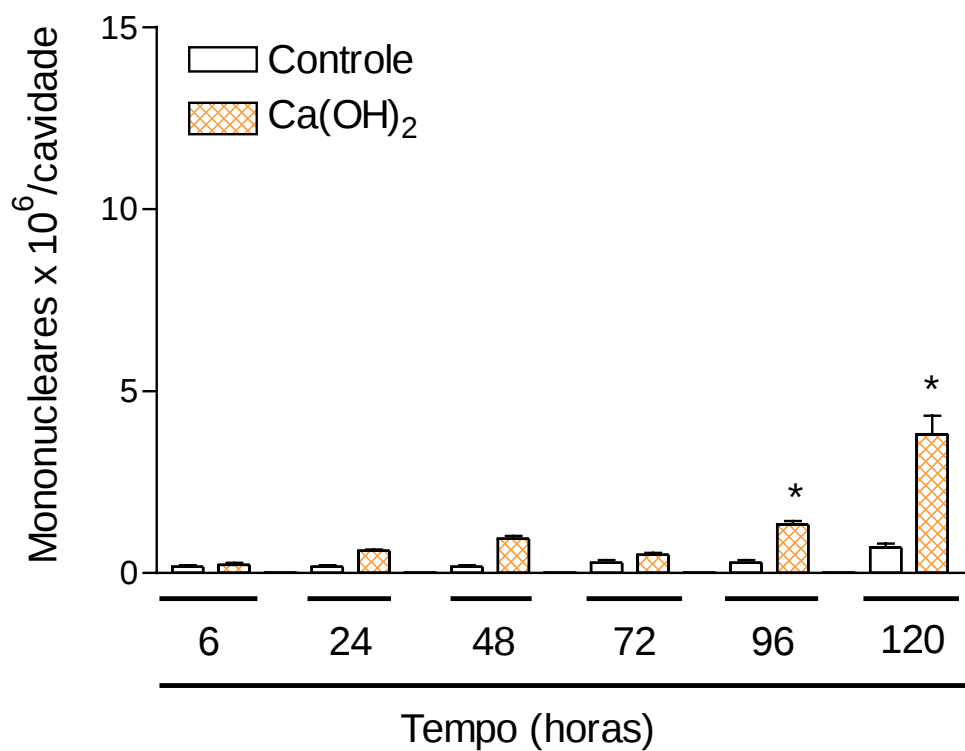


FIGURA 17 Tempo resposta da migração de células mononucleares induzida pelo hidróxido de cálcio.

A migração de células mononucleares, induzida pelo hidróxido de cálcio (500mg/ml), para a bolha de ar subcutânea, foi avaliada 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a injeção do estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de três experimentos. * $p < 0,05$ (em relação ao Grupo Controle) (ANOVA com correção de Bonferroni)

5.2 Efeito de drogas antiinflamatórias sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea

No sentido de investigar os mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para a bolha de ar subcutânea de camundongos, avaliamos o efeito do pré-tratamento dos animais com drogas antiinflamatórias, tais como glicocorticóide (Dexametasona, 1mg/kg, s.c.), inibidor de ciclooxigenases (Indometacina, 5 mg/kg, s.c.; e Meloxicam, 5mg/Kg, v.o) e um inibidor da 5-lipoxigenase (MK 886, 1mg/kg, v.o.). As drogas Dexametasona, Indometacina e Meloxicam foram efetivas em inibir a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para a bolha de ar subcutânea de maneira estatisticamente significativa (Figura 18). Entretanto o MK886 foi inefetivo em inibir essa migração (Figura 18).

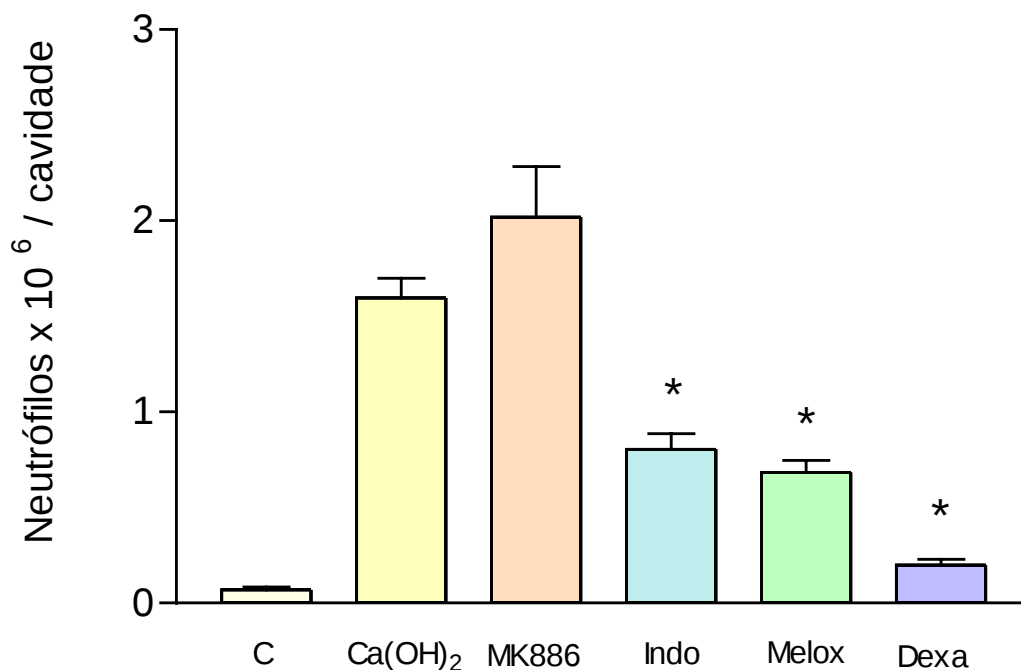


FIGURA 18 Efeito da drogas antiinflamatórias sobre à migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio.

A migração de neutrófilos, induzida pelo hidróxido de cálcio (500mg/ml) para a bolha de ar subcutânea, após o pré-tratamento com diferentes drogas antiinflamatórias foi avaliado 96 horas após a injeção do estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de três experimentos.

* $p < 0,05$ (em relação ao Grupo Ca(OH)_2). (ANOVA com correção de Bonferroni)

5.3 Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio

No sentido de avaliar a participação de células residentes no processo, utilizamos o pré-tratamento dos camundongos com tioglicolato a 3% o qual aumentou cerca de 167% a população de macrófagos na bolha de ar subcutânea (Figura 19 – A e B). Apesar do tratamento com tioglicolato a 3% ter aumentado a população de macrófagos, observamos que este tratamento não alterou a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio. Apesar do aumento da população de macrófagos não ter alterado a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio, a cavidade estava responsiva, visto que a migração de neutrófilos induzida pelo LTB₄ foi potenciada (Figura 19 – B). O fMLP, assim como o hidróxido de cálcio, não foi capaz de induzir alteração no padrão de migração de neutrófilos para a bolha de ar subcutânea, após o aumento da população de macrófagos. (Figura 19-B).

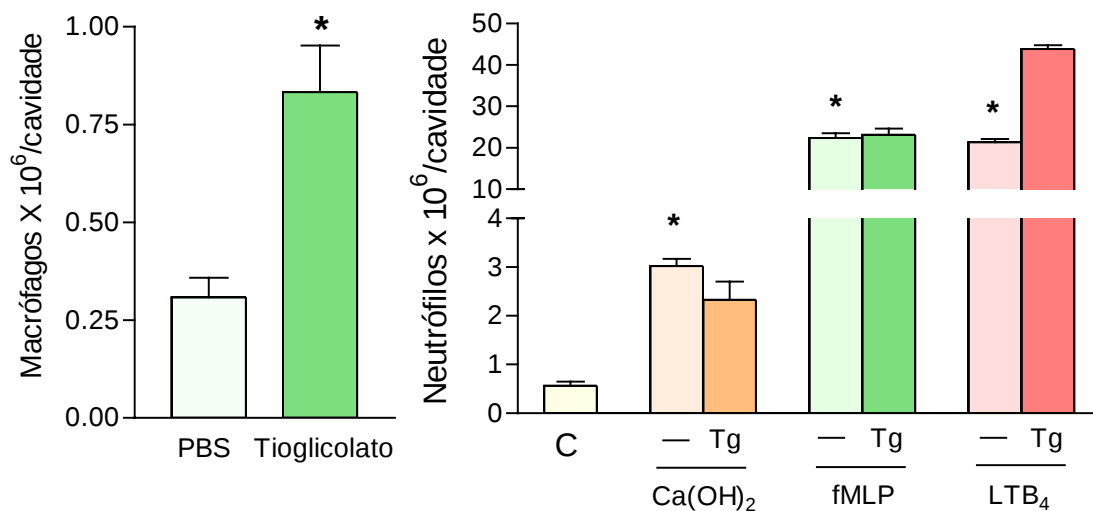


FIGURA 19 A e B Influência do aumento da população de macrófagos sobre a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio.

O efeito do pré-tratamento dos animais com tioglicolato a 3% sobre a migração de neutrófilos para a bolha de ar subcutânea foi avaliado 96 horas após a injeção do estímulo. As barras representam a média $\pm$ EPM de três experimentos. * $p < 0,05$ (ANOVA com correção de Bonferroni).

5.4 Determinação da produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 no exsudato da bolha de ar subcutânea de camundongos estimulados por hidróxido de cálcio

No sentido de avaliar a presença de citocinas e quimiocinas no processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio, a produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 extracelular foram quantificadas utilizando-se o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). A produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 nos grupos estimulados com hidróxido de cálcio se mostrou significativa estatisticamente quando comparada aos grupos controle. A produção de IL1- β , KC e MIP-2 foi inibida quando do pré-tratamento dos animais com um inibidor de COX (meloxicam) e um inibidor de NO (aminoguanidina). Entretanto, a produção de TNF- α não foi inibida quando do uso dessas drogas.

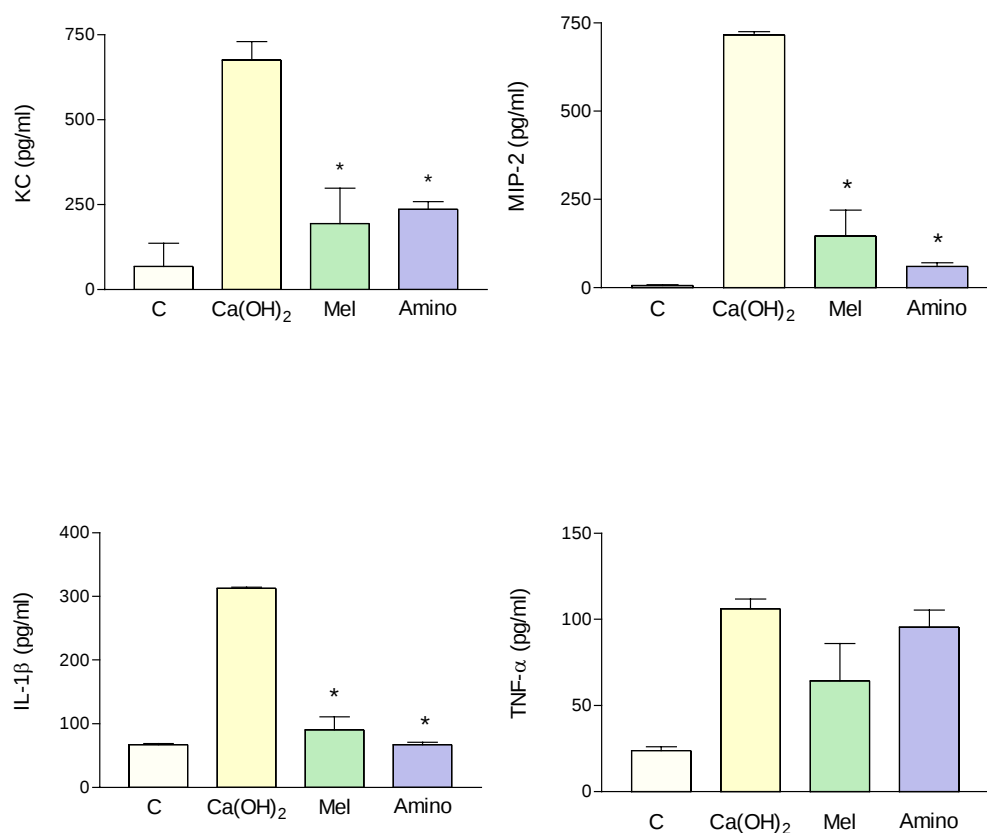


FIGURA 20 - Determinação da produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 no exsudato da bolha de ar subcutânea de camundongos estimulados por hidróxido de cálcio.

A produção de TNF- α , IL1- β , KC e MIP-2 extracelular foram quantificadas foi avaliada 96 horas após a injeção do estímulo. As barras representam a média + EPM de três experimentos. *p<0,05 (em relação ao Grupo Ca(OH)₂). (ANOVA com correção de Bonferroni).

6 Discussão

O hidróxido de cálcio tem sido um material amplamente empregado na odontologia, devido a propriedades que favorecem o processo de reparo. O efeito inicial do hidróxido de cálcio aplicado sobre os tecidos é a formação de zonas de necrose. A ação benéfica desse material é devido à lesão química causada pelos íons hidroxila, limitados por uma zona de necrose próxima ao tecido vital, a qual causa irritação estimulando o processo de reparo. Inicia-se assim, a proliferação vascular e a migração de células inflamatórias, para controlar o agente agressor (EDA, 1961; HOLLAND, 1971; SCHRÖDER, 1985).

Estudos histológicos avaliando o uso do cimento à base de hidróxido de cálcio Sealapex, demonstraram a ocorrência de uma reação inflamatória inicial, sendo possível observar após 7 dias um infiltrado inflamatório mononuclear e a presença de polimorfonucleares neutrófilos (BIRMAN et al., 1990; ECONOMIDES et al., 1995; HOLLAND et al., 2002). Foram observadas também algumas células gigantes multinucleadas próximas ao material a ser fagocitado (ECONOMIDES et al., 1995; HOLLAND et al., 2002). A intensidade da reação inflamatória diminuiu após 14 dias, e posteriormente após 21

dias. Nesse momento foram observados fibroblastos e a proliferação vascular (ECONOMIDES et al.,1995). Células gigantes esparsas e reação de corpo estranho após 60 dias (BIRMAN et al.,1990).

O estudo da resposta tecidual frente ao uso do cimento à base de hidróxido de cálcio CRCS, demonstrou que após 3 dias foi observado um aumento de células inflamatórias crônicas no local (HOLLAND et al.,2002). Um infiltrado inflamatório inicial menos intenso foi observado após 7 dias, também com concentração de neutrófilos e macrófagos (ECONOMIDES et al.,1995; HOLLAND et al.,2002). A intensidade da reação inflamatória diminuiu após 14 dias e 21 dias, sendo possível observar nesse momento, fibroblastos e uma intensa proliferação vascular (ECONOMIDES et al.,1995).

Esse processo inicial da resposta inflamatória induzida pelo hidróxido de cálcio, como foi observado, é seguido pela migração e proliferação de células mesenquimais e endoteliais do tecido pulpar e a formação de colágeno. Nesse momento também ocorre a diferenciação de odontoblastos para a formação de um tecido reparador semelhante à dentina (EDA, 1961; HOLLAND, 1971; SCHRÖDER, 1985).

A avaliação das células que atuam no processo inflamatório tem sido alvo de diversos estudos (SHALABY et al.,1989; DEFORGE et al., 1992; TATAKIS, 1993; BRADY et al., 1995; DRAY, 1995; TEIXEIRA et al., 1997; BAZAN et al., 1997; SMITH et al., 1998; MADDOX, 1998; WITKO-SARSAT et al., 2000; MURDOCH; FINN, 2000). Dessa

maneira, os mecanismos que estão envolvidos na ativação e na migração celular no processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio podem ser de grande importância para o melhor entendimento da ação deste material sobre os tecidos.

Apesar dos diferentes estudos que foram realizados avaliando este processo até o presente momento, nenhum destes trabalhos focalizou os mediadores químicos envolvidos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os mediadores químicos e os mecanismos envolvidos na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio. Para tanto, utilizamos o modelo experimental da bolha de ar subcutânea em camundongos.

O uso da bolha de ar subcutâneo como modelo experimental tem sido descrito em diversos trabalhos (EDWARDS et al., 1981; SEDGEWICK et al., 1985; SEDGEWICK; LEES, 1986; PERRETTI; FLOWER, 1993; MURPHEY; BUESCHER, 1993; PERRETTI et al., 1994). Esse modelo é utilizado para realizar uma análise quantitativa dos fatores envolvidos no processo inflamatório, através da formação de um espaço elíptico simétrico, criado pela injeção de ar no tecido subcutâneo de ratos (SELYE, 1953).

O exame dessa cavidade durante os dias subsequentes à primeira injeção de ar demonstra a presença de uma superfície contendo células conjuntivas com estrutura e aspectos histoquímicos semelhantes aos encontrados em cavidades sinoviais. Essa

semelhança tem sido observada utilizando-se um modelo experimental de no máximo 6 dias (EDWARDS et al., 1981, SEDGEWICK et al., 1985).

Embora existam outros modelos experimentais para estudar a resposta inflamatória aguda, como a cavidade pleural e cavidade peritoneal, a bolha de ar subcutâneo apresenta a vantagem de ser de fácil aplicação técnica, sendo que análise do fluido é simples, podendo ser repetida com traumas mínimos (SEDGEWICK et al., 1985). Um estudo comparando o uso da bolha de ar subcutâneo com o uso da cavidade pleural ou o implante subcutâneo de uma esponja de poliéster embebida com o estímulo demonstrou que um maior aumento no volume do exsudato, no número de leucócitos e concentração de PGE_2 ocorreu no modelo da bolha de ar. Esse modelo experimental também demonstrou ser mais sensível a ação de dois glicocorticóides, a Dexametasona e a Betametasona, demonstrando assim, que essa metodologia apresentou resultados mais satisfatórios, podendo ser indicada, principalmente, como modelo de inflamação articular (SEDGEWICK; LEES, 1986).

Podemos observar ainda, que a utilização da bolha de ar subcutâneo como modelo experimental para estudar o processo inflamatório delimita a participação do mastócito, visto que este espaço é desprovido dessas células residentes, apresentando uma pequena

população de macrófagos e fibroblastos e uma microcirculação ativa (SEDGWICH; LEES, 1986, BALASUBRAMANIAM; HURLEY, 1987).

Nossos resultados puderam demonstrar que o hidróxido de cálcio foi capaz de induzir uma migração de neutrófilos para a bolha de ar subcutâneo de maneira dose-dependente. O recrutamento dessas células ocorreu de maneira significativa 48 horas após a injeção do estímulo, atingindo o pico de migração no período de 96 horas. Após 120 horas da injeção do estímulo observamos uma diminuição no acúmulo destas células, sendo que neste período essa migração de neutrófilos ainda era significativa quando comparada ao Grupo Controle.

Na maioria das formas de inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas (COLLINS, 2000). Essa migração de neutrófilos tem sido alvo de diversos estudos, empregando-se metodologias variadas e outros estímulos que não o hidróxido de cálcio. Dados da literatura demonstraram que uma migração de neutrófilos para bolha de ar subcutâneo induzida pela IL-8 foi observada após 2 a 4 horas, atingindo um pico após 8 horas e vindo a decair após 24 horas (PERRETTI et al., 1994). Em um estudo avaliando o papel do TNF- α na quimiotaxia de leucócitos foi possível observar uma migração de neutrófilos entre 8 e

24 horas para o interstício das vias aéreas de ratos (LUKACS et al., 1995).

Algumas dessas características relacionadas a esse processo inflamatório já haviam sido relatadas em trabalhos de avaliação histológica do comportamento do hidróxido de cálcio em diferentes situações e formulações, onde foi possível observar o acúmulo de neutrófilos, mesmo após uma semana (BIRMAN et al., 1990; ECONOMIDES et al., 1995; BEZERRA SILVA et al., 1997; NELSON FILHO et al., 1999; HOLLAND et al., 2002).

Clinicamente, o hidróxido de cálcio tem sido empregado utilizando-se diferentes veículos, com o objetivo de melhorar propriedades como a hidrossolubilidade deste material, suas características ácido-base e uma maior penetração dentinária, influenciando assim sua velocidade de dissociação e difusão iônica (ESTRELA; BAMMAN, 1999). Neste estudo, foi utilizada a água destilada como veículo, de maneira semelhante ao empregado em outros trabalhos, já que essa é uma formulação freqüentemente utilizada na odontologia (ESBERARD et al., 1996; SAFAVI; NAKAYAMA, 2000; HOSOYA et al., 2001; LYNNE et al., 2003; SOLAK; ÖZTAN, 2003). No entanto, a água destilada não foi diretamente empregada no Grupo Controle, já que promoveria a lise celular, impedindo a avaliação adequada da resposta inflamatória. O PBS, quando utilizado junto ao hidróxido de cálcio, como veículo, ocasionou

extensas áreas de necrose, impedindo a avaliação dos resultados. Avaliando o pH das soluções de hidróxido de cálcio pudemos observar que não ocorreram variações significativas de pH entre a solução que utilizou como veículo a água destilada (pH 12,52) ou o PBS (pH 12,59). Dessa maneira, podemos supor que essas extensas áreas de necrose podem estar relacionadas à possíveis interações entre o hidróxido de cálcio e o cloreto de sódio, presente na solução de PBS, o que levaria à formação de hidróxido de sódio. Este por sua vez é mais solúvel e se difunde com mais facilidade, podendo, portanto, ocasionar uma resposta mais agressiva, levando à necrose tecidual.

No sentido de investigar quais os mediadores químicos que poderiam ser responsáveis pela migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio, utilizamos como ferramenta farmacológica, o pré-tratamento dos animais com drogas antiinflamatórias. Estes resultados demonstraram que a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio foi inibida pelo pré-tratamento dos animais com a Indometacina, meloxicam e dexametasona. Diferentemente, o MK886, foi inefetivo no processo. Diversos estudos têm sido realizados observando alterações na migração de neutrófilos com o uso da Indometacina e diferentes estímulos e modelos experimentais. O uso dessa droga antiinflamatória também inibiu a migração de leucócitos polimorfonucleares em 28 e 45%, nas doses de 1 e 10 mg/Kg (i.p.) utilizando como estímulo o implante subcutâneo de esponjas embebidas em carragenina a 0,5%,

em ratos (GOMEZ et al., 1988). Entretanto, resultados diferentes foram observados em outros estudos, onde a Indometacina (1mg/Kg) não inibiu a migração de neutrófilos para bolha de ar subcutâneo induzida pela IL-1 (PERRETTI; FLOWER, 1993) e também não inibiu a migração de neutrófilos induzida pela injeção intraperitoneal de LTB₄, fMLP e Zymosan (RIBEIRO et al., 1997). Essa diferença nos resultados pode estar relacionada ao uso de modelos experimentais distintos ou devido ao fato do hidróxido de cálcio ser um estímulo indireto, enquanto os demais são estímulos que induzem diretamente a migração de neutrófilos.

Outra droga antiinflamatória utilizada neste estudo foi o meloxicam, inibidor de COX, mais seletivo para COX-2, o qual também demonstrou a ocorrência de uma inibição significativa na migração de neutrófilos para a bolha de ar, corroborando assim, os resultados observados pelo pré-tratamento com a indometacina. Outros estudos empregando esse antiinflamatório, demonstraram que o uso do Meloxicam diminuiu os níveis de PGE₂ e de células polimorfonucleares em um modelo experimental em cavidade articular de ratos, regulando também a atuação da IL-8 (LOPEZ-ARMADA et al., 2002).

Em áreas de inflamação aguda, as prostaglandinas estão comumente presentes, sendo geradas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais. Apresentam diferentes funções e atuam mediando ou modulando a resposta inflamatória, sendo que nas reações

inflamatórias, as prostaglandinas aparecem nos líquidos e exsudatos geralmente 6 a 12 horas após a lesão atuando como vasodilatadores ou agente quimiotáticos para leucócitos, como é o caso de polimorfonucleares neutrófilos (COLLINS, 2000). A inibição da síntese de prostaglandinas, através do uso de drogas antiinflamatórias, as quais bloqueiam a produção de eicosanóides, ocasiona uma diminuição na migração de neutrófilos para o local da inflamação (GOMEZ et al., 1988; PERRETTI; FLOWER, 1993; RIBEIRO et al., 1996; CANETTI et al., 2001; LOPEZ-ARMADA et al., 2002). Portanto, os resultados obtidos neste estudo podem indicar que os produtos da via da ciclooxigenase estão envolvidos na migração de neutrófilos para bolha de ar subcutâneo induzida pelo hidróxido de cálcio.

A outra via do metabolismo do ácido araquidônico ocorre através da ação das enzimas lipoxigenases. A enzima 5-lipoxigenase, predominante nos neutrófilos, resulta principalmente na formação dos leucotrienos, os quais, por sua vez, são também agentes quimiotáticos para neutrófilos. O LTB₄ é um potente ativador das respostas funcionais de neutrófilos, atuando na aderência de leucócitos ao endotélio, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (COLLINS, 2000, HOLGATE; SAMPSON, 2000).

Com o objetivo de determinar se os mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio são produtos do metabolismo do ácido araquidônico, através da via da enzima

lipoxigenase, utilizamos o MK 886, um inibidor específico da enzima 5-lipoxigenase. Essa droga foi avaliada quanto à inibição da enzima 5-lipoxigenase através de estudos *in vivo* e *in vitro* (GILLARD et al., 1989). Observamos, no presente estudo, que o MK 886 não inibiu de maneira significativa a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para a bolha de ar subcutâneo.

Os resultados encontrados nesse estudo estão em desacordo com alguns dados da literatura, os quais demonstram que o LTB₄ é um potente quimiotático e ativador das respostas funcionais de neutrófilos, como a agregação e a aderência dessas células ao endotélio, geração de radicais livres de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas (NAGY et al., 1982; COLLINS, 2000). O uso do MK886 inibiu a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos, induzida por ovalbumina (CANETTI et al., 2001). Entretanto, dados da literatura também demonstram, semelhantemente ao que observamos, que em alguns modelos experimentais o MK-886 não inibiu de maneira significativa a migração de neutrófilos. Em um estudo utilizando sialoproteínas e fosfoproteínas dentinárias como estímulo, a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos não foi inibida pelo uso dessa droga (SILVA et al., 2004). Resultados semelhantes foram observados, utilizando como modelo experimental a indução da resposta inflamatória em cavidade articular de joelhos de ratos com o uso da ovalbumina. A inibição da migração de neutrófilos para esse

sítio inflamatório também não foi observada com o uso do MK-886 (BOMBINI et al., 2004). É importante salientar que a cavidade criada pela bolha de ar subcutâneo é bem semelhante à cavidade articular, onde o pré-tratamento com MK886 também foi inefetivo.

A migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio também foi inibida nos animais que foram pré-tratados pela dexametasona. A inibição da migração de neutrófilos para bolha de ar subcutâneo, utilizando-se a dexametasona, também foi observada utilizando-se como estímulo a IL-1 (PERRETTI; FLOWER, 1993) ou carragenina, colostro ou uma associação de ambos (MURPHEY; BUESCHER, 1993). Utilizando como modelo experimental a cavidade peritoneal de ratos, a dexametasona também inibiu a migração de neutrófilos induzida pela IL-8 (RIBEIRO et al., 1991), pelo LTB₄, fMLP e zymosan (RIBEIRO et al., 1996), por ovalbumina (CANETTI et al., 2001) e por sialoproteínas e fosfoproteínas dentinárias (SILVA et al., 2004). Essa inibição também foi observada em um foco inflamatório em espaço articular de joelho de ratos, induzido pela ovalbumina (BOMBINI et al., 2004).

A dexametasona é um glicocorticóide que atua impedindo a ação da enzima fosfolipase A₂, responsável pela liberação do ácido araquidônico da membrana celular. Isso ocorre devido à produção de proteínas anti-fosfolipase A₂, as quais atuam inibindo a produção de eicosanóides (SAUTEBIN et al., 1992). Além de inibir a fosfolipase A₂,

esse glicocorticóide também atua inibindo a síntese e conseqüente liberação de citocinas e quimiocinas e também alguns de seus efeitos (MUNCK et al., 1990). Com base nestes dados, procuramos investigar a possível participação de citocinas tais como TNF- α , IL-1 β e quimiocinas, como MIP-2 e KC, que são quimiotáticas para neutrófilos em nosso modelo experimental.

Os resultados obtidos demonstraram que os animais estimulados com o hidróxido de cálcio apresentam um aumento significativo na liberação desses mediadores. No exsudato inflamatório, a liberação de KC, MIP-2 e IL-1 β pôde ser inibida nos animais pré-tratados com um inibidor de COX (meloxicam), o que não veio a ocorrer com o TNF- α , que se manteve em níveis semelhantes mesmo após esse pré-tratamento. Esses dados demonstram a possível atuação de metabólitos do ácido araquidônico sobre a liberação de KC, MIP-2 e IL-1 β , durante a resposta inflamatória induzida pelo hidróxido de cálcio.

Dados da literatura demonstraram que o TNF- α , de maneira tempo e dose-dependente, aumentou a expressão de MIP-2 em células endoteliais, sendo que o pré-tratamento com um glicocorticóide (dexametasona) inibiu essa expressão, demonstrando a atuação desta droga sobre a expressão de MIP-2 por células endoteliais ativadas por citocinas (LIU et al., 2000). O KC é um mediador fundamental para o recrutamento de neutrófilos em uma inflamação aguda dependente de

mastócitos, em pele de ratos. Entretanto, o pré-tratamento com a dexametasona também inibiu essa migração de neutrófilos induzida por mastócitos, através da diminuição da secreção de KC (SCHRAMM et al., 2002).

No presente estudo, quando os animais foram pré-tratados com um inibidor da enzima sintase do óxido nítrico induzida, aminoguanidina, foi possível observar uma diminuição significativa na liberação de KC, MIP-2 e IL-1 β , demonstrando uma associação entre a expressão desses mediadores e a presença de NO. Ao contrário, o pré-tratamento com a aminoguanidina também não alterou a liberação do TNF- α , demonstrando que a expressão dessa citocina ocorreu independente da ação do NO.

Dados da literatura avaliando a atuação da enzima NOS induzida sobre a regulação da migração de neutrófilos demonstraram resultados semelhantes. A injeção intraperitoneal de zymosan induziu um aumento na liberação de óxido nítrico, sendo essa resposta associada a aumentos nos níveis de MIP-2 e KC. Esses resultados puderam demonstrar que a enzima NOS induzida atuou regulando a liberação dessas quimiocinas pró-inflamatórias (AJUEBOR et al., 1998). Em conjunto, nossos dados demonstram que a liberação de MIP-2, KC e IL-1 β é dependente da produção de prostaglandinas e óxido nítrico.

Diferentemente, a liberação de TNF- α parece ser direta, ou seja, independente da produção dos respectivos mediadores.

No sentido de investigar o papel das células residentes no processo inflamatório induzido pelo hidróxido de cálcio, observamos que a migração de neutrófilos ocorreu independente de mastócitos, de acordo com a metodologia empregada nesse estudo, já que nesse modelo experimental, utilizando a bolha de ar subcutâneo, é observado um espaço sem mastócitos com uma pequena população de macrófagos e fibroblastos e uma microcirculação ativa (SEDGWICH; LEES, 1986, AALASUBIAMANIAM; HURLEY, 1987).

Para investigarmos o papel do macrófago na migração de neutrófilos para bolha de ar subcutâneo, induzida pelo hidróxido de cálcio, aumentamos a população destas células com o pré-tratamento dos animais com tioglicolato a 3%. Os resultados demonstram que a migração de neutrófilos ocorreu de maneira independente de macrófagos residentes, já que o aumento desta população de células não alterou de maneira significativa a migração de neutrófilos. Entretanto, é importante ressaltar que existem também células estruturais residentes presentes na bolha de ar subcutâneo, as quais podem estar relacionadas com a resposta inflamatória induzida pelo hidróxido de cálcio, como os fibroblastos ou células endoteliais (BELLINGAN, 2000).

Os fibroblastos atuam sintetizando proteínas da matriz, como o colágeno e a fibronectina, mas, apresentam também a capacidade de sintetizar diversas citocinas, principalmente sob estimulação com IL-1 e TNF- α , produzidas inicialmente durante a reação inflamatória. Os fibroblastos também atuam produzindo PGE₂, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, atuando como mecanismo regulador sobre as células residentes (JORDANA et al., 1994; SMITH et al., 1997). Esses dados podem demonstrar um papel importante na manutenção do processo inflamatório, devido a uma interação entre fibroblastos e citocinas. Em nosso modelo experimental, podemos sugerir que possivelmente os fibroblastos tenham um papel importante como célula estrutural residente responsável pela liberação dos mediadores inflamatórios.

Em conclusão, nossos dados demonstram que a migração de neutrófilos induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutâneo não depende da presença de mastócitos e nem de macrófagos. O recrutamento de neutrófilos é induzido pela presença de PGs, TNF, IL-1 β , KC e MIP-2 presentes no exsudato inflamatório.

7 Conclusão

Estudando os mecanismos envolvidos na migração celular induzida pelo hidróxido de cálcio para bolha de ar subcutânea em camundongos, concluímos que:

- ✓ O hidróxido de cálcio induz a migração de neutrófilos;
- ✓ O pico de migração de neutrófilos ocorre 96 horas após a injeção do estímulo, sendo que após 120 horas ocorre uma diminuição dessa migração e um aumento da quantidade de células mononucleares;
- ✓ A ação de glicocorticóides ou de inibidores de COX, mas não de inibidor da 5-lipoxigenase, inibiu a migração de neutrófilos, sugerindo a participação de metabólitos da enzima ciclooxigenase, citocinas e quimiocinas no processo inflamatório;
- ✓ A migração de neutrófilos foi dependente de KC, MIP-2, IL1- β , TNF- α e Prostaglandina, sendo que essa liberação não foi proveniente de mastócitos nem de macrófagos.

- ✓ A liberação de MIP-2, KC e IL-1 β foi dependente da produção de prostaglandinas e óxido nítrico, visto que o meloxicam e a aminoguanidina foram capazes de reduzir os níveis desses mediadores, respectivamente. Diferentemente, a liberação do TNF- α ocorreu independente da ação de prostaglandinas e óxido nítrico.

8 *Referências*

Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (mta) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003; 36(3):225-31.

Ajuebor MN, Virag L, Flower RJ, Perretti M, Szabo C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology* 1998; 95(4):625-30.

Alaçam T, Yoldas HO, Gülen O. Dentin penetration of 2 calcium hydroxide combinations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86(4):469-72.

Allard V, Stromberg V, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3(5): 240-4.

Anthony DR, Gordon TM, Del Rio CE. The effect of three vehicles on the ph of calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54(5): 560-5.

Ardeshtna SM, Qualtrough AJE, Worthington HV. An in vitro comparison of pH changes in root dentine following canal dressing with calcium hydroxide points and conventional calcium hydroxide paste. *Int Endod J* 2002; 35(3): 239-44.

Assreuy J, Cunha F, Liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 108(3): 833-7.

Augsburger RA, Wong MT. Pulp management in dens evaginatus. *J Endod* 1996; 22(6): 323-6.

Azabal-Arroyo M, Menasalvas-Ruiz G, Martin-Alonso J, Arroquia JJH, Vega-del Barrio JM. Loss of hydroxyl ions from gutta-percha points with calcium hydroxide in their composition: an in vitro study. *J Endod* 2002; 28(10): 697-8.

Balasubramaniam GS, Hurley JV. The structure and reactions of the microcirculation in a subcutaneous air pouch in the rat. *J Pathol* 1983; 151(2): 139-46.

Barbosa CA, Gonçalves RB, Siqueira Júnior JF, De Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. a clinical and laboratory study. J Endod 1997; 23(5):297-300.

Barker BWC, Mayne JR. Some unusual cases of apexification subsequent to trauma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1975; 39(1):144-50.

Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Göbel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. J Endod 2002; 28(6):427-30.

Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. Crit Care Med 2002;30 (1 Suppl): S27-S35.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Sao K, Rossi D et al. A new class of membrane bound chemokine with a CX3C motif. Nature 1997; 385(6617):640-4.

Behnen MJ, West LA, Liewehr R, Buxton TB, Mcpherson JC. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. J Endod 2001; 27(12):765-7.

Bellingan G. Leucocytes: friend or foe. Intensive Care Med 2000; 26: (Supp 1): p.S111-S8.

Benenati F. Treatment of a mandibular molar with perforating internal resorption. J Endod 2001;27(7):474-5.

Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. J Periodontol 1993; 64(5 suppl): 456-60.

Binnie WH, Rowe AHR. A histological study of the periapical tissues of incompletely formed pulpless teeth filled with calcium hydroxide. J Dent Res 1973; 52(5): 1110-6.

Birman EG, Sampaio JMP, Magalhães J, Sato E. Estudo das propriedades físicas e biológicas de um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio. Rev Odontol Univ São Paulo 1990; 4(1):p.25-30.

Blanco L, Cohen S. Treatment of crown fractures with exposed pulps. J Calif Dent Assoc 2002;30(6):419-25.

Bombini G, Canetti C, Rocha FA, Cunha FQ. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004; 496(1-3):197-204.

Bowen RL. Effect of particle shape and size distribution in a reinforced polymer. *J Am Dent Assoc* 1964; 69(4): 481-95.

Brady HR, Papayianni A, Serhan CN. Potential vascular roles for lipoxins in “stop programs” of host defense and inflammation *Trends Cardiovasc Med* 1995; 5(5):186 –92.

Buckingham JC, Flower RJ. Lipocortin 1: a second messenger of glucocorticoid action in the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Mol Med Today* 1997; 3:296-302.

Butcher EC. Leucocyte-endothelial cell recognition: three or more steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67(6):1033-6.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1(5):170-5.

Çalışkan MK. Clinical reability of the dentine bridge formed after pulpotomy: a case report. *Int Endod J* 1994; 27(1): 52-55.

Çalışkan MK, Turkun M. Root canal treatment of a root-fractured incisor tooth with internal resorption: a case report. *Int Endod J* 1996; 29(6):393-7.

Çalışkan MK, Gomel M, Turkun M. Surgical extrusion of intruded immature permanent incisors: case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86(4):461-4.

Çalışkan MK, Türkün M, Gökay N. Delayed replantation of avulsed mature teeth with calcium hydroxide treatment. *J Endod* 2000; 26(8):472-6.

Çalt S, Serper A, Özçelik B, Dalat MD. pH changes and calcium ion diffusion from calcium hydroxide dressing materials trough root dentin. *J Endod* 1999; 25(5):329-31.

Camões ICG, Salles MR, Chevitaresh O, Gomes GC. Influence on pH of vehicle containing glycerin used with calcium hydroxide. *Dent Traumatol* 2003; 19(3):132-8.

Canalda C, Pumarola J. Bacterial growth inhibition produced by root canal sealer cements with a calcium hydroxide base. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1989; 68(1): 99-102.

Canetti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Tumor necrosis factor- α and leukotriene B₄ mediate the neutrophil migration in immune inflammation. Br J Pharmacol 2001; 134(8):1619-28.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(21):13926-31.

Collins, T. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran R S, Kruman V, Collins T. Robbins. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.44-78.

Cotti E, Lusso D, Dettori C. Management of apical inflammatory root resorption: report of a case. Int Endod J 1998; 31(4): 301-4.

Crosher RF, Dinsdale RCW, Holmes A. One visit apicectomy technique using calcium hydroxide cement as the canal filling material combined with retrograde amalgam. Int Endod J 1989; 22(6): 283-9.

Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of peripaical repair and apical closure of immature. *Odontol Revy* 1972; 23(1): 27-44.

Cvek M, Granath L, Cleaton-Jones P, Austin J. Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. *J Dent Res* 1987; 66(6):1166-74.

Deforge LE, Fantone JC, Kenney JS, Remick DG. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest* 1992; 90(5): 2123–9.

De Moore RJG, De Witte AMJC. Periapical lesions accidentally filled with calcium hydroxide. *Inter Endod J* 2002; 35(11):946-958.

Dias DB, Bausells HII, Lia RCC, Esberard RM. Efeito de materiais à base de hidróxido de cálcio, em polpas de dentes decíduos de cães expostas experimentalmente. *Rev Odontol UNESP* 1988; 17(1/2):27-42.

Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75(2):125-31.

Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF- α in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. Eur J Immunol 2002; 32(2): 393-403.

Duarte MAH, Demarchi ACCO, Giaxa MH, Kuga MC, Fraga SC, Souza LCD. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. J Endod 2000; 26(7):389-90.

Economides N, Kotsaki-kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. J Endod 1995; 21(3):122-7.

Eda S. Histochemical analysis on the mechanism of dentin formaion in dog's pulp. Bull Tokyo Dent Coll 1961; 2(2): 59-88.

Edwards JCW, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. J Pathol 1981; 134(2): 147-56.

Elias JA, Gustilo K, Baeder W, Freundlich B. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Immunol 1987; 138(11):3812-6.

Esberard RM, Carnes DL, Del Rio CE. Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. J Endod 1996; 22(8):402-5.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Fellipe-Júnior O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. Rev Fac Odontol Bauru 1994; 2:31-8.

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

Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. Braz Dent J 1996; 7(1): 41-6.

Estrela C, Lopes HP, Felipe-Júnior O, Sydney GB. Chemical analysis of calcium carbonate present in various calcium hydroxide samples. Braz Endod J 1997; 2:7-9.

Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann I I. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J Endod 1998; 24(1):15-7.

Estrela C, Bammann I I. Efeito enzimático do hidróxido de cálcio. Rev ABO Nac 1999; 7(1):32-42.

Estrela C, Bammann I I, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. Int Endod J 2001; 34(5): 341-5.

Estrela C, Estrela CRA, Bammann I I, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. J Endod 2001; 27(12):720-3.

Estrela C, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Surface tension of calcium hydroxide associated at different substances. Braz Endod J 2002; 6:23-5.

Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. Blood 1999;94(10):3281-8.

Faccioli LH, Souza GE, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions* 1990;30(3-4):344-9.

Faraco Junior IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide. *Dent Traumatol*, 2001; 17(4):163-6.

Ferguson FS, Friedman S, Frazzetto V. Successful apexification technique in an immature tooth with dens in dent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 49(4): 356-9.

Fidel RAS, Silva R G, Spanó JCE, Barbin EL, Pécora JD. Evaluación "in vitro" del pH de algunos cementos endodónticos que contienen hidróxido de calcio. *Rev. Folia/Oral* 1995; 1(2):65-7.

Filippi A, Pohl Y, Kirschner H. Replantation of avulsed primary anterior teeth: treatment and limitations. *ASDC J Dent Child* 1997;64(4):272-5.

Ghose LJ, Baghdady VS, Hikmat BYM. Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *J Endod* 1987; 13(6): 285-90.

Gillard J, Ford-Hutchinson AW, Chan C, Charleson S, Denis D, Foster A, Fortin R, Leger S, McFarlane CS, Morton H, et al. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67(5):456-64.

Gilroy DW, Tomlinson A, Willoughby DA. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47(2): 79-85.

Giro EMA, Bausells HII, Percinoto C. Estudo histopatológico em molares decíduos de cães, com polpas vitais, submetidos à pulpotomia e proteção com hidróxido de cálcio, formocresol e glutaraldeído. *Rev Odontol UNESP* 1991; 20:51-62.

Goldberg F, Masson EJ, Spielberg C. Evaluation of the dentinal bridge after pulpotomy and calcium hidroxide dressing. *J Endod* 1984; 10(7):318-20.

Gomes APM, Araujo EAF, Gonçalves SEP, Kräft R. Treatment of traumatized permanente incisors with crown and root fractures: a case report. *Dent Traumatol* 2001; 17(5):236-9.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Rosalen FDG, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. J Endod 2002; 28(11): 758-61.

Gomez LA, Ramis J, Julve J, Garcia-Rafanell J, Forn J. The effect of fosfosal and acetylsalicylic acid on leukocyte migration and PGE2 concentration in experimentally induced acute inflammation. Eur J Pharmacol 1988;147(3):459-63.

Gordon TM, Ranly DM, Boyan BD. The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations in pH and calcium concentration. J Endod 1985; 11(4):156-60.

Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the elements. New York:Pergamon Press 1984; 117-54.

Gregoriou AP, Jeansonne BG, Musselman RJ. Timing of calcium hydroxide therapy in the treatment of root resorption in replanted teeth in dogs. Endod Dent Traumatol 1994;10(6):268-75.

Guedes Pinto, AC. Tratamento endodôntico em dentes decíduos. In: Guedes Pinto, AC. Odontopediatria. São Paulo: Santos, 2003. p.553-73.

Gupta S, Sharma A, Dang N. Apical bridging in association with regular root formation following single-vist apexification: a case report. Quintessence Int 1999; 30(8):560-2.

Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. Lancet 1999; 353(9149): 307-14.

Heilig J, Yates J, Siskin M, McKnight J, Turner J. Calcium hydroxide pulpotomy for primary teeth: a clinical study. J Am Dent Assoc 1984; 108(5):775-8.

Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. J Br Endod Soc 1975; 8(2):74-93.

Ho CH, Khoo A, Tan R, The J, Lim KC, Sae-Lim V. pH changes in root dentin after intracanal placement improved calcium hydroxide containing gutta-percha points. J Endod 2003;29(1):4-8.

Holgate ST, Sampson AP. Antileukotriene therapy: future directions. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161(2 pt 2):S147-53.

Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. Rev Bras Pesq Med e Biol 1971; 4:83-95.

Holland R, Mello W, Nery MJ, Souza V, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. Healing process after pulpotomy and covering with calcium hydroxide, Dycal ou MPC: histological study in dog teeth. Rev Fac Odont Araçatuba 1978; 7(2):185-191.

Holland R, Souza V, Mello W, Russo MC. Healing process of the pulp stump and periapical tissue in dog teeth. III – histopathological findings following root filling with calcium hydroxide. Rev Fac Odont Araçatuba 1978; 7(1):25-37.

Holland R, Mello W, Nery MJ, Souza V, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. Root canal treatment with calcium hydroxide: Effect of debris and pressure. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1979; 47(2):185-8.

Holland R, Mello W, Nery MJ, Souza V, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. J Am Dent Assoc 1979; 99(3):472-5.

Holland R, Mello W, Nery MJ, Souza V, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. Healing process of dog's dental pulp after pulpotomy and pulp covering with calcium hydroxide in powder or paste form. Acta Odontol Pediatr 1981; 2(2):47-51.

Holland R, Pinheiro CE, Mello W, Nery MJ, Souza V. Histochemical analysis of the dog's dental pulp after pulp capping with calcium, barium and strontium hydroxides. J Endod 1982; 8(10):444-7.

Holland R, de Mello W, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA. Reaction of the pulp and periapical tissue of dog teeth with incompletely formed foramina, following pulpotomy and protection with calcium hydroxide or formocresol: Remote histological study. Rev Esp Endodoncia 1983;1(1): 33-8.

Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. J Endod 1985; 11(12):535-43.

Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Dezan Junior E. Calcium hydroxide and a corticosteroid-antibiotic association as dressings in cases of biopulpectomy. A comparative study in dogs' teeth. Braz Dent J 1998; 9(2): 67-76.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Júnior E et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. J Endod 2002; 28(3):173-6.

Holland R, Souza V, Mello W, Nery MJ, Souza V, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histological study. JADA 2002; 99:472-475.

Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan Junior E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dog's teeth with apical periodontitis. J Endod 2003; 29(2):121-4.

Holtzman I, Lezion R. Endodontic treatment of maxillary canine with dens invaginatus and immature root. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1996; 82(4):452-5.

Hosoya N, Takahashi G, Arai T, Nakamura J. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. J Endod 2001; 27(5):343-6.

Ida K, Maseki T, Yamasaki M, Hirano S, Nakamura H. pH values of pulp-capping agents. J Endod 1989; 15(8):365-8.

Imhof BA, Dunon D. Basic mechanism of leukocyte migration. Horm Metab Res 1997; 29(12): 614-21.

Jerrell RG, Courts FJ, Stanley HR. A comparison of two calcium hydroxide agents in direct pulp capping of primary teeth. ASDC J Dent Child 1984; 34-8.

Jordana M, Särnstrand B, Sime PJ, Ramis I. Immune-inflammatory functions of fibroblasts. Eur Respir J 1994; 7(12): 2212-22.

Kinirons MJ, Srinivasan V, Welbury RR, Finucane D. A study in two centers of variations in the time of apical barrier detection and barrier position in non vital immature permanent incisors. Int J Paediat Dent 2001; 11(6):447-51.

Kitasako Y, Shibata S, Cox CF, Tagami J. Location, arrangement and possible function of intradentoblastic collagen fibres in association with calcium hydroxide induced hard tissue bridges. Int Endod J 2002; 35(12): 996-1004.

Kleier DJ, Barr ES. A study of endodontically apexified teeth. Endod Dent Traumatol 1991; 7(3): 112-7.

Kopel HM. Considerations for the direct pulp capping procedure in primary teeth: a review of the literature. ASDC J Dent Child 1992; 59(2):141-9.

Kvietys PR, Sandig M. Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? News Physiol Sci 2001; 16:15-9.

Lands WEM. Mechanisms of action of antiinflammatory drugs. Adv Drug Res 1985; 14:147-63.

Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Leonardo RT, Consolaro A. Effect of intracanal dressings on repair and apical bridging of teeth with incomplete root formation. Endod Dent Traumatol 1993; 9(1): 25-30.

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed A. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. J Endod 1993; 19(7):348-52.

Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. J Endod 2000; 26(6):328-30.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing: histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J*. 2002;13(1):17-22.

Liu NT, Rainger GE, Nash GB. Differential ability of exogenous chemotactic agents to disrupt transendothelial migration of flowing neutrophils. *J Immunol* 2000; 164(11): 5961-69.

Lolis E. Glucocorticoid counter regulation: macrophage migration inhibitory factor as a target for drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*. 2001; 1(6):662-8.

Lopez-Armada MJ, Sanchez-Pernaute O, Largo R, Diez-Ortego I, Palacios I, Egido J et al. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61(11):1027-30.

Lukacs N W, Strieter RM, Chensue SW, Widmer M, Kunkel SL. TNF- α mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol* 1995; 154(10): 5411-17.

Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol* 2002; 14(2): 105-13.

Lynne R, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *J Endod* 2003; 29(3):187-90.

Mackie IC, Hill FJ, Worthington HV. Comparison of two calcium hydroxide pastes used for endodontic treatment of non-vital immature incisor teeth. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10(2): 88-90.

Maddox JF, Colgan SS, Clish CB, Petasis NA, Fokin VV, Serhan CN. Lipoxin B4 regulates human monocyte/neutrophil adherence and motility: design of stable lipoxin B4 analogs with increased biologic activity. *FASEB J* 1998; 12(6): 487-94.

Martin LR, Gilbert B, Dickerson AW 2nd. Management of endodontic perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 54(6):668-77.

Meade EA, Smith WL, DeWitt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993; 268(9): 6610-14.

Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10(1): 27-39.

Mello W, Holland R, Souza V. Pulp capping with calcium hydroxide or zinc oxide eugenol paste. Comparative histological study in dogs. *Rev Fac Odontol Aracatuba* 1972; 1(1): 33-44.

Miñana M, Carnes Junior DL, Walker W. pH changes at the surface of root dentin after intracanal dressing with calcium oxide and calcium hydroxide. *J Endod* 2001; 27(1):43-5.

Mitchell JA, Akarasereenont P, Thierermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(24): 11693-7.

Montenegro MR, Fecchio D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: Montenegro MR, Franco M. *Patologia: processos gerais* 4º ed. São Paulo: Atheneu; p.109-28.

Morrie JJ, Benay G, Hartmann C, Barsotti O. Antimicrobial activity of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dental cements : an in vitro study. J Endod 2003; 29(1):51-4.

Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. Lab Invest 2002; 82(5):521-33.

Muller GJ. Aspirin, other salicylates and non-steroidal anti-inflammatory agents. SADJ 2004; 59(7):283.

Munck A, Mendel DB, Smith LI, Orti E. Glucocorticoid receptors and actions. Am Rev Respir Dis. 1990 Feb;141(2 Pt 2):S2-10.

Murdock C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious disease. Blood 2000; 95(10): 3032-43.

Murphey DK, Buescher ES. Human colostrum has anti-inflammatory activity in a rat subcutaneous air pouch model of inflammation. Pediatr Res 1993; 34(2):208-12.

Nagy L, Lee TH, Goetzl EJ, Pickett WC, Kay AB. Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. Clin Exp Immunol 1982; 47(3): 541-7.

Nedley MP. The pulpectomy in primary teeth. J Mich Dent Assoc 2002; 84(8):38-42.

Negm MM, Combe EC, Grant AA. Reaction of the exposed pulps to new cements containing calcium hydroxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1981;51(2):190-204.

Nelson Filho P, Silva LAB, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide based root canal medicaments. Int Endod J 1999; 32(4): 303-11.

Nurko C, Garcia-Godoy F. Evaluation of calcium hydroxide / iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth. J Clin Pediatr Dent 1999. 23(4):289-94.

Nurko C, Ranly DM, Garcia-Godoy F, Lakshmyya KN. Resorption of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth: a case report. Pediatr Dent 2000; 22(6):517-20.

Oliveira SHP, Faccioli LH, Cunha FQ, Ferreira SH. Role of resident peritoneal cells in eosinophil migration induced by saline. Int Arch Allergy Immunol 1994; 104(4): 323-31.

Oliveira SHP. Investigação dos mecanismos envolvidos na migração de eosinófilos induzida pelo Sephadex e participação do óxido nítrico na atividade microbicida dessa célula. Tese[Doutorado]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 1998.

Oliveira SHP, Costa CHS, Ferreira SH, Cunha FQ. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB₄, TNF- α , IL-8 and PAF. *Inflamm Res* 2002; 51(3): 144-53.

Ozcelik B, Tasman F, Ogan C. A comparison of the surface tension of calcium hydroxide mixed with different vehicles. *J Endod* 2000; 26(9):500-2.

Panzarini SR, Souza V, Holland R, Dezan Júnior E. Tratamento de dentes com lesão periapical crônica. influência de diferentes tipos de curativo de demora e do material obturador do canal. *Rev Odontol UNESP* 1998; 27(2): 495-508.

Pashley DH, Kalathoor S, Burnham D. The effects of calcium hydroxide on dentin permeability. *J Dent Res* 1986; 65(3): 417-20.

Perretti M, Flower RJ. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J Immunol* 1993; 150(3):992-9.

Peretti M, Harris JG, Flower RJ. A role for endogenous histamine in interleukin-8-induced neutrophil infiltration into mouse air-pouch: investigation of modulatory action of systemic and local dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1994;112(3): 801-8.

Pérez F, Franchi M, Péli JF. Effect of calcium hydroxide form and placement on root dentine pH. *Int Endod J* 2001; 34(6):417-423.

Pisanti S, Sciaky I. Origin of calcium the repair wall after pulp exposure in the dog. *J Dent Res* 1964; 43:641-4.

Quackenbush L. "In vitro" testing of three types of endodontic medicaments against anaerobic bacterial. *J Endod* 1986; 12:132-6.

Ramos CDL, Heluy-Neto NE, Ribeiro RA, Ferreira SH, Cunha FQ. Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINC-1. *Cytokine* 2003; 21(5): 214-23.

Ranly DM, Garcia-Godoy F. Reviewing pulp treatment for primary teeth. *J Am Dent Assoc* 1991;122(10):83-5.

Ranly DM. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. *Pediatr Dent* 1994; 16(6):403-9.

Reyes AD, Reina ES. Root canal treatment in necrotic primary molars. *J Pedod* 1989;14(1):36-9.

Ribeiro RA, Flores CA, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunol* 1991; 73(4): 472-7.

Ribeiro RA, Souza-Filho MVP, Souza MHLP, Oliveira SHP, Costa CHS, Cunha FQ, Ferreira SH. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112(1):27-35.

Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, Loetscher P, Wilkinson TS, Jones SA, Topley N. Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN- γ controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immun* 2001; 167(2): 1028:38.

Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease state. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227–57.

Rosendahl R, Weinert-Grodd A. Root treatment o primary molars with infected pulps using calcium hydroxide as a root canal filling. J Clin Pediatr Dent 1995; 19(4):255-8.

Saad AY. Calcium hydroxide in the treatment of external root resorption. J Am Dent Assoc 1989;118(5):579-81.

Safavi KE, Nichols F. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod 1994; 20(3):127-9.

Safavi K, Nakayama T. Influence of mixing vehicles on dissociation of calcium hydroxide solutions. J Endod 2000; 26(11):649-51.

Sautebin L, Carnuccio R, Ialenti A, Di Rosa M. Lipocortin and vasocortin: two species of anti-inflammatory proteins mimicking the effects of glucocorticoids. Pharmacol Res 1992; 25(1): 1-12.

Schäfer E, Al Behaissi A. pH changes in root dentin after root canal dressing with gutta-percha points containing calcium hydroxide. J Endod 2000; 26(11):665-7.

Schramm R, Schaefer T, Menger MD, Thorlacius H. Acute mast cell-dependent neutrophil recruitment in the skin is mediated by KC and LFA-1: inhibitory mechanisms of dexamethasone. *J Leukoc Biol* 2002 ; 72(6):1122-32.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64(suppl. 1): 541-8.

Schröder U, Szpringer-Nodzak M, Janicha J, Wacinska M, Budny J, Mlosek K. A one-year follow-up of partial pulpotomy and calcium hydroxide capping in primary molars. *Endod Dent Traumatol* 1987;3(6): 304-6.

Sciaky I, Pisanti S. Localization of calcium placed over amputated pulps in dog's teeth. *J Dent Res* 1960; 39:1128-32.

Sedgwick AD, Moore AR, Al-Duaij AY, Edwards JCW, Willoughby DA. The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis. *Br J Exp Path* 1985; 66(4): 455-65.

Sedgwick AD, Lees P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Act* 1986; 18(3/4):439-46.

Segura JJ, Llamas R, Rubio-Manzanares AJ, Jimenez-Planas A, Guerrero JM, Calvo JR. Calcium hydroxide inhibits substrate adherence capacity of macrophages. *J Endod* 1997; 23(7):444-7.

Selye H, Canalda M. On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury: an experimental study with granuloma pouch technique. *J Am Med Assoc* 1953; 152(13):1207-13.

Serhan CN, Haeggstron JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J* 1996; 10(10): 1147-58.

Seux D, Couble ML, Hartman MDJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast like cyto differentiation of human pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide containing cement. *Arch Oral Biol* 1991; 36(2): 117-28.

Shalaby MR, Waage A, Espernik T. Cytokine regulation of Interleukin-6 production by human endothelial cells. *Cell Immunol* 1989, 121(2): 372-82.

Silva LAB, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod* 1997; 23(2): 86-90.

Silva FT, Pugliesi NS, Araújo VC. Resposta do tecido conjuntivo pulpar frente ao hidróxido de cálcio p.a. associado a soro fisiológico. *RPG* 1996; 3(1):59-65.

Silva LABS, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hidroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002; 28(2): 94-8.

Silva TA, Lara VS, Silva JS, Garlet GP, Butler WT, Cunha FQ. Dentin sialoprotein and phosphoprotein induce neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, TNF-beta, and CXC chemokines. *Calcif Tissue Int* 2004; 74(6):532-41.

Siqueira Júnior JF, De Uzeda M. Desinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. J Endod 1996; 22(12):674-6.

Siqueira Júnior JF, De Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole and calcium hydroxide associates with three vehicles. J Endod 1997; 23(3):167-9.

Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. Am J Pathol 1997; 151(2): 317-22.

Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson P. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. Proc Natl Acad Sci 1998; 95(22): 13313-18.

Solak H; Öztan MD. The pH changes of four different calcium hydroxide mixtures used intracanal medication. J Oral Rehabil 2003; 30(4):436-9.

Sousa-Neto MD, Santos ES, Estrela C, Saquy PC, Pecora JD. Treatment of middle-apical level root fracture in necrotic teeth. Aust Endod J 2000; 26(1):15-8.

Stevens RH, Grossman LI. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. J Endod 1983; 9(9):372-4.

Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with enterococcus faecalis. J Endod 2002; 28(2): 102-4.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. J Endod 2002; 28(4):295-9.

Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. J Periodontol 1993; 64(5 suppl): 416-31.

Teixeira MM, Wills TN, Lukacs NW, Proudfoot AE, Kunkel SL, Williams TJ et al. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergy model in mouse skin. J Clin Invest 1997; 100(7):1657-66.

Toledo OA. Terapia Endodôntica em Decíduos. In: Toledo OA. Odontopediatria. Fundamentos para prática clínica. 2° ed. São Paulo: Premier; 223-37.

Tripp CS, Unanue ER, Needleman P. Monocyte migration explains the changes in macrophage arachidonate metabolism during the immune response. Proc Natl Acad Sci 1986; 83:9655-9.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. J Endod 1980; 7(1):17-21.

Tronstad L. Root resorption: etiology terminology and clinical manifestations. Endod Dent Traumatol 1988; 4(6): 241-52.

Trope M, Moshonov J, Nissan R, Bux P, Yesilsoy C. Short vs. long-term calcium hydroxide treatment of established inflammatory root resorption in replanted dog teeth. Endod Dent Traumatol 1995; 11(3):124-8.

Tziafas D, Economides N. Formation of crystals on the surface of calcium hydroxide-containing materials in vitro. J Endod 1999; 25(8):539-42.

Ulbrich H, Eriksson E, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(12): 640-7.

Vajrabhaya L. Nonsurgical endodontic treatment of a tooth with double dens in dente. *J Endod* 1989;15(7):323-5.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231(25): 232-5.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Wolloughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91(6): 2046-50.

Wakabayashi H, Horikawa M, Funato A, Onodera A, Matsumoto K. Bio-microscopical observation of dystrophic calcification induced by calcium hydroxide. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9(4): 165-70.

Waly NG. A five-year comparative study of calcium hydroxide-glutaraldehyde pulpotomies versus calcium hydroxide pulpotomies in young permanent molars. *Egypt Dent J* 1995; 41(1):993-1000.

Weisenseel JA, Hicks ML, Pelleu GB. Calcium hydroxide as an apical barrier. J Endod 1987; 13(1):1-5.

Weiger R, Heuchert T. Management of an avulsed primary incisor. Endod Dent Traumatol 1999;15(3):138-43.

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

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. Lancet 2000; 355(9204): 646-8

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest 2000; 80(5):617-53.

Yeh SC, Lin YT, Lu SY. Dens invaginatus in the maxillary lateral incisor: treatment of 3 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999; 87(5):628-31.

Yates JA. Barrier formation time in non-vital teeth with open apices. Int
Endod J 1988; 21(5): 313-9.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO B SOLUÇÕES

1 TAMPÃO SALINA-FOSFATO (PBS)

Cloreto de sódio P. A. (Merck).....	8,0 g
Cloreto de potássio P. A. (Merck).....	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico P. A. (Merck).....	1,15 g
Fosfato de potássio monobásico P. A. (Merck).....	0,2 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p.....	1 L

O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl e a solução autoclavada antes de ser utilizada

2 LÍQUIDO DE TURK

Ácido Acético Glacial P.A. (Merck)	20 ml
Azul de metileno (Merck)	0,5 g
Água deionizada Milli-Q q.s.p.	1 L

3 REAGENTE DE GRIESS

***Solução I* - H_3PO_4 5%**

H_3PO_4 25 mL

Água deionizada Milli-Q50 mL

Solução II

Sulfanilamida (Sigma).....0,5 g

H_3PO_4 5%25 mL

Solução III

Diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED)0,05 g

Água deionizada Milli-Q25 mL

Deixar as soluções estoque a 4°C. Na hora do ensaio, misturar uma parte da solução I, uma parte da solução II, uma parte da solução III e uma parte de água destilada.

4 Solução de Tris (0,1 M)

Tris (Sigma) 6,1 g

Água deionizada Milli-Q q.s.p.500 ml

O pH foi ajustado para 8.