

ALESSANDRA CRISTINA GOMES

Avaliação da capacidade de mineralização e
citotoxicidade do MTA, Sealapex e Sealapex plus

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia, Campus de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos para obtenção do título de
“Doutor em Odontopediatria”

Orientador: Prof Titular Célio Percinoto

ARAÇATUBA
2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G633a Gomes, Alessandra Cristina.
Avaliação da capacidade de mineralização e citotoxicidade do
MTA, Sealapex e Sealapex plus / Alessandra Cristina Gomes. -
Araçatuba : [s.n.], 2010
86 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Odontologia, Araçatuba, 2010
Orientador: Prof. Célio Percinoto

1. Materiais biocompatíveis 2. Endodontia 3. Citotoxicidade
4. Cimentos dentários

Black D27
CDD 617.645

Dados Curriculares

ALESSANDRA CRISTINA GOMES

Nascimento	14 de setembro de 1976 Ribeirão Pires/SP
Filiação	João Eduardo Gomes Neide Gomes
1997-2000	Curso de Graduação em Odontologia – Faculdade Metodista de Piracicaba - UNIMEP
2001-2002	Curso de aperfeiçoamento em Odontologia para bebês – Universidade Estadual de Londrina – UEL
2002-2004	Curso de especialização em Odontopediatria – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP
2005-2006	Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araçatuba
2007-2007	Curso de Atualização em Ortodontia preventiva – Faculdade de Odontologia de Araçatuba
2007-2009	Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Dedicatória

Dedicatória

Ao meu marido **Marcelo**, por me mostrar o significado do verdadeiro amor, pela paciência infinita e dedicação incansável. Amo você!

À minha filha **Lara**, pela felicidade que trouxe em minha vida. Nos momentos difíceis, um simples sorriso foi capaz de me dar forças para não desistir. Amo você!

Aos meus pais, **João Eduardo e Neide**, meu reconhecimento e gratidão pelo incansável incentivo para o meu crescimento profissional e pessoal, sem os quais não poderia estar hoje neste momento tão especial. Muito obrigada!

Ao meu irmão, **João Eduardo** e minha cunhada **Carolina**, pelo carinho, orientação, preocupação e apoio nos momentos difíceis nesse período. Vocês foram muito importantes e são peças-chave para que eu viesse até o fim dessa jornada. Muito obrigada!

Agradecimentos especiais

Agradecimentos Especiais

A Deus,

Em momentos difíceis, quando alguns obstáculos pareciam intransponíveis e os sonhos distantes e quase impossíveis, foi acreditando em sua existência que consegui prosseguir. Obrigada senhor!

Ao Prof. Titular Célio Percinoto

Agradeço por sua orientação, pela oportunidade de realizar este trabalho, por ter acreditado e confiado em mim desde o início. Ofereço minha gratidão, admiração e respeito.

Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Agradeço pelo incentivo e apoio para a realização deste trabalho. Simon Bolívar já dizia “o educador deve ser não um sábio, mas sim um homem diferenciado por sua educação, pela força de seus costumes, pela naturalidade de seus modos, jovial, dócil, acessível, franco, enfim, em quem se encontre muito que imitar e pouco que corrigir”. E é exatamente assim que eu o vejo: exemplo de verdadeiro educador!

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, nas pessoas do **Diretor Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Prof Dra. Ana Maria Pires Soubhia.**

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Prof. Dr. Célio Percinoto, Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem e Profa. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar**, por todo este longo período de convivência, pelas orientações valiosas e ensinamentos transmitidos.

Aos professores da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Prof Dr Roberto Holland, Prof. Dr. Valdir de Souza, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, Prof. Dr. Dr. Mauro Nery, Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho e Prof. Dr. Eloi Dezan Junior**, por me receberem da maneira tão especial como fui recebida, pelo carinho e amizade durante o curso.

Ao Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa da **Prof. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira**. Muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos, pelo carinho e amizade.

Às funcionárias da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Hermelinda de Jesus Pereira Before, Neuza Angélica dos Santos e Neuci Vieira**. Muito obrigada por todo apoio durante a realização deste trabalho e pela convivência agradável e amizade.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP, **Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva**, pela ajuda constante, pela dedicação e por apoio neste nosso longo tempo de convívio.

Aos amigos de turma da pós-graduação da Odontopediatria, **Taís, Eliana, Janaína e Max**. Pessoas especiais que tive o prazer de conhecer, por todos os momentos que passamos juntos.

A todos os colegas do curso de **Pós-graduação da Odontopediatria** pela convivência amigável e momentos de descontração

À **Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa e Simone Watanabe** que me ajudaram na realização deste trabalho.

À amiga **Nenê**, pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Marina Midori Sakamoto Hawagoe, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Diogo Reatto** pelo excelente profissionalismo, atenção dispensada e primoroso relacionamento.

Aos funcionários da Biblioteca: **Ana Cláudia Grieger Manzatti, Cláudia de Souza Frare, Cláudio Hideo Matsumoto, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Jéssica Durbergr, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez, Fernando Sukunishi e Cláudio Maciel Júnior**, pela atenção e eficiência que sempre dispensaram.

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

À **empresa Ângelus®** por ter fornecido o MTA utilizado nos experimentos.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho de pesquisa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

GOMES, AC. **Avaliação da capacidade de mineralização e citotoxicidade do MTA, Sealapex e Sealapex plus** 2010. 86f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

A necessidade de melhorar a qualidade dos materiais utilizados no tratamento endodôntico tem estimulado o estudo de vários materiais buscando melhores condições de trabalho, biocompatibilidade e capacidade de estimular a mineralização dos tecidos. Este trabalho teve a finalidade de avaliar a capacidade de mineralização do MTA, Sealapex e Sealapex plus (combinação entre MTA e Sealapex) usando o implante de tubos de dentina preenchidos com os materiais em tecido subcutâneo de ratos e a citotoxicidade e a produção de citocinas (IL-1 β e IL-6) por fibroblastos de camundongos estimulados por estes cimentos. Para avaliação da capacidade de mineralização foram utilizados 32 ratos, os quais receberam individualmente dois implantes de tubos de dentina contendo os cimentos ou tubos vazios que serviram de controle. Os períodos de avaliação foram 7 e 30 dias. Após cada período experimental, quatro animais foram sacrificados e os tubos de dentina juntamente com o tecido que o circunda foram removidos, fixados e processados para análise em microscopia óptica. As peças foram incluídas em uma mistura de parafina e cera de carnaúba (5%). As secções foram feitas seriadamente com 10 μ m de espessura e foram coradas de acordo com a técnica Von Kossa ou permaneceram sem coloração para serem visualizadas sob luz polarizada em microscópio óptico. Os critérios de avaliação foram: cápsula fibrosa fina quando < 150 μ m e espessa quando > 150 μ m. Necrose e

calcificação foram registradas como presente ou ausente. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Qui-quadrado. A formação de tecido mineralizado e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas em todos os materiais nos tempos de 7 e 30 dias.

Para o teste de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos de camundongos (L929) que foram incubados em placas de 24 poços e estimulados com tubos de polietileno preenchidos com os cimentos testados. Culturas de células sem os materiais foram utilizadas como controle. Após 24 horas de estimulação, a citotoxicidade foi avaliada através do ensaio colorimétrico de redução de MTT. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA com correção de Bonferroni, com $p < 0,05$. Os cimentos MTA, Sealapex e Sealapex plus não inibiram a viabilidade celular.

Para a avaliação da produção de IL-1 β e IL-6 por fibroblastos estimulados com os cimentos foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA). Os materiais foram inseridos no fundo da placa de 24 poços e condensados até atingirem aproximadamente 1 mm de espessura e o mesmo diâmetro dos poços. O material foi deixado tomar presa por 2 semanas em meio de cultura DMEM. Poços sem material serviram como controle. Fibroblastos da linhagem L929 foram semeados e incubados por 24 horas. Após este período, o meio foi coletado e analisado para IL-1 β e IL-6. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA com correção de Bonferroni, com $p < 0,05$. Todos os materiais liberaram IL-6 e IL-1 β . Os resultados sugerem que MTA, Sealapex e Sealapex plus foram biocompatíveis tanto em tecido subcutâneo de rato como em cultura de fibroblastos. Além disso, todos os cimentos foram capazes de estimular a

mineralização, favorecendo o processo de reparo pela liberação de IL-6 e IL-1 β .

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Endodontia. Citotoxicidade.

Cimentos dentários.

Abstract

GOMES, AC. **Evaluation of mineralization ability and cytotoxicity of MTA, Sealapex and Sealapex plus.** Araçatuba, 2010. 86p. Thesis (Doctor Degree in Pediatric Dentistry) – Unesp- Univ Estadual Paulista, 2010.

The quality improvement of the endodontic materials is a need that has been stimulating the study of several materials aiming better work conditions, biocompatibility and mineralized tissue stimulation ability. The present work aimed to evaluate the mineralization ability of MTA, Sealapex and Sealapex plus (combination between MTA and Sealapex) using the implant of dentin tubes filled with the materials into the subcutaneous tissue of rats, the cytotoxicity, and cytokines production (IL-1 β and IL-6) by fibroblasts stimulated by the materials. Thirty two rats were used for the tissue reaction test which received two implants of dentine tubes filled with the materials or empty tubes were used as control. The periods of evaluation were 7 and 30 days. After each period of evaluation, four animals were killed and the tubes and the surrounding tissue were removed, fixed and processed to be evaluated in optic microscope. The specimens were embedded in a mixture of paraffin and carnauba wax (5%). The sections were serially cut with 10 μ m and stained with Von Kossa or remained without staining to be evaluated under polarized light. The evaluation criteria were: fibrous capsule thin < 150 μ m and thick > 150 μ m. Necrosis and calcification were recorded as present or absent. The results were statistically analyzed using Qui-square test. Mineralization and birrefringent granulations to polarized light were observed with all materials and in both periods of observation. For the cytotoxicity test, fibroblasts from mice (L929) were incubated in 24 well plates and stimulated with polyethylene tubes filled with the

materials. Cells cultured without the materials stimulation were used as control. After 24 hours of stimulation, the cytotoxicity was evaluated using the reduction colorimetric test (MTT). The results were analyzed using ANOVA and Bonferroni's correction tests ($p < 0.05$). MTA, Sealapex and Sealapex plus did not inhibited the cell viability. ELISA was used for the evaluation of the production of IL-1 β and IL-6 by fibroblasts stimulated with the materials. The materials were inserted in the deep of 24 wells plates and condensed until the 1 mm thick and the same diameter of the wells. The materials were set for 2 weeks in DMEM medium. Wells without material served as control. Fibroblasts (L929) were seed in the wells and incubated for 24 hours, when the medium was collected and analyzed for IL-1 β and IL-6. The results were analyzed using ANOVA and Bonferroni's correction tests ($p < 0.05$). All materials produced IL-1 β and IL-6. The results suggested that MTA, Sealapex and Sealapex plus were biocompatible in subcutaneous tissue of rats and in fibroblasts culture. Moreover, all materials were able to stimulate the mineralization, favoring the healing process with the production of IL-1 β and IL-6.

Key words: Biocompatible Materials. Endodontics. Cytotoxicity. Sealer.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1 Grupo controle **(A)** 7 dias. Ausência de granulações Von kossa positivo próxima à abertura dos tubos (7dias, VK, 50x). **(B)** Ausência de granulações Von kossa positivo próxima à abertura dos tubos (30 dias, Vk, 100X).

Figura 2 MTA **(A)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (7 dias, VK, 50x), **(B)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (30 dias, VK, 50x). **(C)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (7 dias, luz polarizada, 50x). **(D)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (30 dias, luz polarizada, 50x).

Figura 3 Sealapex **(A)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (7 dias, VK, 50x), **(B)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (30 dias, VK, 50x). **(C)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (7 dias, luz polarizada, 50x). **(D)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (30 dias, luz polarizada, 50x).

Figura 4 Sealapex plus **(A)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (7 dias, VK, 100x). **(B)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (30 dias, VK, 100x). **(C)** Notar numerosas granulações (flechas),

birrefringentes à luz polarizada (7 dias, luz polarizada, 100x). **(D)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (30 dias, luz polarizada, 100x).

Capítulo 2

Figura 1 Viabilidade dos fibroblastos na presença de MTA, Sealapex e Sealapex plus, após estímulo de 24 horas. MTA, Sealapex e Sealapex Plus não inibiram a viabilidade celular. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

Figura 2 Liberação de IL-6 por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus (combinação entre MTA e Sealapex), após estimulação por um período de 24 horas. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

Figura 3 Liberação de IL-1 β por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus (combinação entre MTA e Sealapex), após estimulação por um período de 24 horas. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 Escores relativos às características da cápsula fibrosa e ocorrência de calcificação ou de necrose para cada grupo e período experimental.

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Teste de análise de Variância.
BONFERRONI	Teste de comparação de média.
DMEM	Meio de Eagle modificado por
Dulbecco.	
CO2	Dióxido de carbono ou gás carbônico
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
IL-1 β	Interleucina- 1beta.
IL-6	Interleucina-6.
<i>In vitro</i> (latim)	em laboratório.
<i>In vivo</i> (latim)	no ser humano.
MTA	Agregado de Trióxido Mineral.
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-
difeniltetrazólico.	
mm	milímetro
nm	nanômetro
PBS	Tampão salino fosfato.
pH	potencial hidrogeniônico.
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo.
QUI-QUADRADO	Teste de associação entre variáveis
independentes.	
μm	Micrômetro

Sumário

Introdução Geral	21
Capítulo 1 - Avaliação da capacidade de mineralização do MTA, Sealapex e Sealapex plus em tecido subcutâneo de rato	
<i>Resumo</i>	26
<i>Abstract</i>	27
1.1 Introdução	28
1.2 Proposição	31
1.3 Material e Método	32
1.4 Resultados.....	36
1.5 Discussão	43
1.6 Referências	46
Capítulo 2 - Avaliação da viabilidade celular e produção de citocinas induzida pelo MTA, Sealapex e Sealapex plus	
<i>Resumo</i>	52
<i>Abstract</i>	53
1.7 Introdução	54
1.8 Proposição	57
1.9 Material e Método	58
1.10 Resultados.....	61
1.11 Discussão	65
1.12 Referências	69
Anexos	76

Introdução Geral

Introdução Geral

A manutenção e a integridade da dentição são essenciais para condições estéticas e funcionais adequadas, sendo muitas vezes necessária a realização da terapia endodôntica. Embora a evolução das técnicas operatórias tenha possibilitado a redução do número de complicações no tratamento endodôntico, perfurações radiculares podem ainda estar presentes na clínica odontológica.

As perfurações radiculares são consideradas, na maioria das vezes, como complicações e acidentes no tratamento endodôntico e foram definidas como comunicações artificiais, normalmente de etiologia iatrogênica, ou ainda de origem patológica (processo de cárie ou reabsorção), comunicando a cavidade pulpar com os tecidos periodontais (1).

O material ideal para o reparo de perfurações deve ser biocompatível, fácil manipulação, dimensionalmente estável e não ser afetado pela presença de umidade. Além disso, deve ser capaz de selar o sistema de canais radiculares e induzir osteogênese e cementogênese (2). Apesar de alguns materiais terem sido desenvolvidos há muito tempo e estarem ainda em uso clínico, tem havido uma preocupação cada vez maior não só com as propriedades mecânicas, mas também com a biocompatibilidade destes materiais (3)

Na tentativa de se obter sucesso no tratamento das perfurações radiculares muitos materiais incluindo Cavit IRM, amálgama, Super EBA, compostos resinosos e ionômero de vidro têm sido testados, mas nenhum deles possui todos os requisitos (4,5).

No início da década de 90, a equipe de pesquisadores da Universidade de Loma Linda, Califórnia – EUA idealizaram e desenvolveram um material com o objetivo de selar todas as comunicações entre o sistema de canais radiculares, e a superfície externa do dente. Este foi denominado de agregado de trióxido mineral ou MTA (5).

O MTA é um material biocompatível (6), indutor de dentinogênese, cementogênese e osteogênese (7,8,9,10), hidrófilo (11), radiopaco (12), antimicrobiano (13), capaz de promover selamento adequado (14,15) prevenindo microinfiltração bacteriana (16) e infiltração de endotoxinas (17). De forma geral, tem-se observado que o MTA apresenta propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis, sendo amplamente empregado no tratamento endodôntico. Por outro lado, apesar de suas inúmeras características positivas, este material apresenta algumas dificuldades durante sua manipulação, um tempo de presa demorado e um tempo de trabalho relativamente curto (12,18), fatores estes que poderiam, por sua vez, desestimular seu uso em algumas situações clínicas.

Os cimentos à base de hidróxido de cálcio para obturação de canal radicular foram objetos de uma série de trabalhos experimentais que analisaram tanto suas propriedades físico-químicas quanto biológicas. O Sealapex tem mostrado biocompatibilidade junto à polpa dental, excelente ação bactericida por apresentar um pH elevado, boa capacidade de selamento por induzir a reparação por formação de tecido duro, baixa infiltração marginal e controle da reabsorção radicular inflamatória (19,20,21,22,23,24)

Na tentativa de melhorar as propriedades de trabalho do MTA, uma combinação de dois materiais com características biológicas individuais

adequadas (Sealapex e MTA), denominada Sealapex plus está sendo proposta. Esta combinação de materiais demonstrou alta capacidade de selamento marginal e baixa infiltração marginal quando utilizada em obturações de dentes humanos extraídos (25). No entanto, antes da indicação clínica, é necessário testar a biocompatibilidade deste novo material e para tanto, a utilização de modelos experimentais “*in vivo*”, como o subcutâneo de ratos e “*in vitro*”, como a cultura de células.

Desta forma, o estudo foi dividido em 2 capítulos, sendo cada um deles escrita em formato de artigo, com objetivo de tornar o trabalho mais didático e facilitar sua divulgação nos meios de pesquisa.

No primeiro capítulo, **“Avaliação da capacidade de mineralização do MTA, Sealapex e Sealapex plus em tecido subcutâneo de rato”**, foi avaliada a capacidade de indução de mineralização do MTA, Sealapex e Sealapex plus empregando-se como modelo experimental, o implante de tubos de dentina preenchidos com os materiais em subcutâneo de ratos.

No segundo capítulo, **“Avaliação da viabilidade celular e produção de citocinas induzida pelo MTA, Sealapex e Sealapex plus”**, foi avaliada a viabilidade celular através do ensaio MTT e a produção de citocinas (IL-1 β e IL-6) através do ensaio ELISA em cultura de fibroblastos de camundongos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus.

Capítulo I

**Avaliação da capacidade de mineralização
do MTA, Sealapex e Sealapex plus em
tecido subcutâneo de rato**

Resumo

Introdução: A necessidade de melhorar a qualidade dos materiais utilizados no tratamento endodôntico tem estimulado o estudo de vários materiais buscando melhores condições de trabalho. Este trabalho teve a finalidade de avaliar a capacidade de mineralização do MTA, Sealapex ou Sealapex plus (combinação entre MTA e Sealapex) em tecido subcutâneo de ratos. **Métodos:** Os materiais foram colocados em tubos de dentina e implantados em tecido subcutâneo de ratos Wistar. A análise histológica foi realizada após 7 e 30 dias. Os espécimes foram preparados para serem corados com Von Kossa e sem coloração para luz polarizada. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Qui-quadrado. **Resultados:** Grânulos Von Kossa positivos que foram birrefringentes à luz polarizada foram observados em todos os materiais nos tempos de 7 e 30 dias. **Conclusão:** Os resultados sugerem que MTA, Sealapex e Sealapex plus estimularam a mineralização do tecido.

Descritores: Materiais Biocompatíveis. Endodontia. Agregado de Trióxido Mineral.

Abstract

Introduction: The need for improving the quality of the endodontic materials has stimulated the study of several materials aiming better work conditions. The aim of this study was to evaluate the tissue reaction of subcutaneous connective tissue of rats to the implant of dentin tubes filled with MTA, Sealapex or Sealapex plus (combination of Sealapex and MTA). **Methods:** These materials were placed in dentine tubes and implanted into dorsal connective tissue of Wistar rats. The histological analysis was achieved after 7 and 30 days. The specimens were prepared to be stained to Von Kossa or without stained to polarized light. The results were analysed by Qui-square test. **Results:** At the 7th and 30th, the undemineralized sections exhibited birefringent granulations to polarized light as well as extensive and irregular areas which were positive to Von Kossa staining in all the materials. **Conclusion:** The results suggest that MTA, Sealapex and Sealapex Plus stimulated the mineralization of the tissue.

Key-words: Biocompatible Materials. Endodontics. Mineral Trioxide Aggregate.

Capítulo 1

1.1- Introdução

O material ideal para o reparo de perfurações deve ser biocompatível, fácil manipulação, dimensionalmente estável e não ser afetado pela presença de umidade. Além disso, deve ser capaz de selar o sistema de canais radiculares e induzir osteogênese e cementogênese (1). Muitos materiais incluindo Cavit IRM, amálgama, Super EBA, compostos resinosos e ionômero de vidro têm sido testados, mas nenhum deles possui todos os requisitos (2,3).

O agregado de trióxido mineral (MTA) foi desenvolvido para perfurações patológicas ou iatrogênicas, bem como material obturador de cavidades (3,4). Alguns estudos demonstraram que o MTA promove reação tecidual favorável, caracterizado por ausência de resposta inflamatória severa, presença de cápsula fibrosa, formação de tecido mineralizado e selamento de perfurações radiculares (4,5). A formação de ponte de dentina cobrindo o tecido pulpar, também foi encontrada após o capeamento pulpar com MTA (6). Além disso, à natureza hidrofílica das partículas do pó do MTA permite sua utilização mesmo na presença de umidade (3). No entanto, apresenta propriedades de trabalho que não são ideais. O cimento resultante da mistura do pó com a água é de difícil manipulação (7), seu tempo de presa tem sido relatado ser em torno de 3 horas, enquanto o tempo de trabalho menor que 4 minutos (8). Além disso, é necessário umidade para ativar a presa do cimento (5).

*Este texto foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Endodontics (Anexo B)

O Sealapex é um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio clinicamente utilizado devido ao favorável processo de reparo relacionado dentre outros fatores à difusão de íons (9). Esta difusão de íons provenientes do cimento aumenta o pH da superfície radicular adjacente aos tecidos periodontais e favorecem o reparo (10). O pH alto favorece a ação antimicrobiana (11), degradação de lipopolissacarídeos bacterianos (12), bem como, a indução de formação de tecido duro (13) e o controle da reabsorção radicular inflamatória (14,15).

Uma combinação experimental entre Sealapex e MTA (Sealapex Plus) foi proposta no intuito de obter propriedades biológicas semelhantes às do MTA, mas com melhores propriedades de trabalho, tais como aumento no tempo de trabalho, facilidade de inserção e manutenção da capacidade de selamento marginal (16).

A necessidade de materiais biocompatíveis implica na necessidade de testes de biocompatibilidade. Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem contudo, causar danos ou prejuízo ao mesmo (17).

A presença e liberação de substâncias do material podem gerar diferentes reações quando em contato com tecidos vivos. A reação varia em função da substância, da quantidade liberada e da taxa de reabsorção (3). Tais substâncias podem influenciar no processo de reparo, o que justifica a importância do estudo da reação tecidual em modelos experimentais antes da sua utilização clínica.

Embora o Sealapex plus apresente características positivas para ser usado como material para perfurações radiculares, pois une dois materiais com características favoráveis, não existem estudos avaliando a reação tecidual após a sua implantação.

1.2 - Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de mineralização do MTA, Sealapex e Sealapex plus em tecido subcutâneo de rato.

1.3- MATERIAL E MÉTODO

Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), com idades aproximadas de 120 dias, pesando entre 250-280g provenientes do biotério da Universidade Estadual Paulista (campus Araçatuba). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), ração sólida e água “ad libitum”. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (ANEXO A).

Cimentos

Foram utilizados os seguintes cimentos: MTA cinza (Ângelus Soluções em Odontologia, Londrina-Pr, Brasil), Sealapex (Sybron Endo, Glendora, USA) e Sealapex Plus (combinação entre Sealapex e MTA). Os cimentos foram preparados de acordo com instruções do fabricante. O Sealapex Plus foi obtido através de uma combinação de 0,15g de Sealapex e 0,5g de MTA.

Tubos de dentina

Foram utilizados 64 tubos de dentina, preparados a partir de raízes de dentes humanos extraídos por condições diversas. Os canais foram alargados até a lima K #35 e sobreinstrumentados em 2 mm além do forame apical. Durante todo procedimento foi realizada irrigação com solução de hipoclorito de

sódio 1%. O comprimento dos tubos foi padronizado em 7mm e o diâmetro das paredes em 0,5mm. O desgaste foi realizado com broca Endo-Z movida em caneta de alta rotação. Em seguida, os tubos ficaram imersos em EDTA 17% por 3 minutos, lavados com soro fisiológico e autoclavados. Os tubos de dentina foram completamente preenchidos pelos materiais a serem avaliados (18).

Procedimentos cirúrgicos.

Em cada animal foi realizada a injeção intramuscular de sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e de anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg).

Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal e antissepsia da área desprovida de pêlos com gaze embebida em solução aquosa de PVPI 10%. Em seguida, com lâmina de bisturi número 15 foi realizada uma incisão de 2 cm no dorso do animal, tendo a coluna vertebral como linha média de marcação. Então, o tecido subcutâneo foi divulsionado e foi introduzido 1 tubo com o material em estudo de cada lado da incisão. Os tubos foram implantados com o apoio de pinça reta, sendo que cada rato recebeu um total de dois tubos preenchidos pelo mesmo material. Os tubos de dentina foram preenchidos com MTA, Sealapex ou Sealapex Plus com auxílio de uma espiral lentulo movida por micromotor de baixa rotação e condensadores antes de serem implantados nos animais. Todos os procedimentos foram realizados sob condições estéreis.

As incisões foram suturadas com fio de seda 4-0 não reabsorvível e receberam nova antisepsia com PVPI 10%.

Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de serem devolvidos ao biotério para se aguardar os períodos experimentais.

Grupos experimentais

De acordo com os materiais empregados e tempos pós-operatórios, os 32 ratos foram divididos em 4 grupos, sendo 3 grupos experimentais e 1 grupo controle. Cada grupo experimental foi composto de 8 ratos, sendo 4 para cada tempo pós-operatório (7 e 30 dias). O grupo controle foi composto por tubos de dentina vazios.

Obtenção das peças

De acordo com os grupos, os animais foram sacrificados aos 7 e 30 dias por meio de uma dose excessiva de anestésico. Após o sacrifício, foi realizada a tricotomia da região dorsal, antisepsia da área com PVPI 10% e uma nova incisão com lâmina de bisturi número 15, tendo a coluna vertebral como linha média de marcação. Os tubos foram localizados e removidos de modo a incluir todo o tecido que o envolvia.

Processamento laboratorial

As peças foram colocadas em frascos individuais identificados contendo solução de formalina a 10% por 48 horas. Após este período, as peças foram lavadas em água corrente por 5 horas para remoção da solução de fixação.

As peças foram incluídas em uma mistura de parafina (95%) e cera de carnaúba (5%) (13). As secções foram feitas seriadamente com 10µm de espessura utilizando um micrótomo de tecido duro. As secções foram obtidas uma a uma, sempre após a aplicação de parafina na superfície do bloco para prendê-las em lâminas de vidro aquecidas e besuntadas com albumina. As secções foram coradas de acordo com a técnica Von Kossa, ou permaneceram sem coloração para serem visualizadas sob luz polarizada em microscópio óptico. A técnica Von Kossa foi utilizada para observar estruturas mineralizadas nos tecidos (coradas de preto). A técnica para luz polarizada permite observar estruturas birrefringentes relacionadas com cristais de carbonato de cálcio originadas da combinação de íons cálcio do material com gás carbônico do tecido (18).

As reações nos tecidos em contato com o material na abertura dos tubos foram observadas, sendo atribuídos escores. A cápsula fibrosa foi considerada fina quando < 150µm e espessa quando > 150µm. A presença de necrose bem como a formação de calcificação em contato com o material testado foi registrada como presente ou ausente.

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística, através do Teste Qui-quadrado, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

1.4- RESULTADOS

Controle (tubos vazios)

No 7º dia, granulações Von kossa positivas não foram observadas à abertura dos tubos (Fig.1A).

No 30º dia, granulações Von kossa positivas não foram observadas à abertura dos tubos (Fig.1B).

MTA

No 7º dia, granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas à abertura dos tubos (Fig. 2A e 2C)

No 30º dia, granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas à abertura dos tubos (Fig. 2B e 2D).

Sealapex

No 7º dia, granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas à abertura dos tubos (Fig. 3A e 3C)

No 30º dia, granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas à abertura dos tubos (Fig. 3B e 3D).

Sealapex plus

No 7º dia, granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas à abertura dos tubos (Fig. 4A e 4C)

No 30º dia, granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas à abertura dos tubos (Fig. 4B e 4D).

Comparação entre os grupos

Os valores encontrados foram comparados em cada período de tempo e são apresentados na tabela 1

Dia 7

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre MTA, Sealapex e Sealapex plus. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais testados e o grupo controle ($p<0,05$).

Dia 30

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre MTA, Sealapex e Sealapex plus. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais testados e o grupo controle ($p<0,05$).

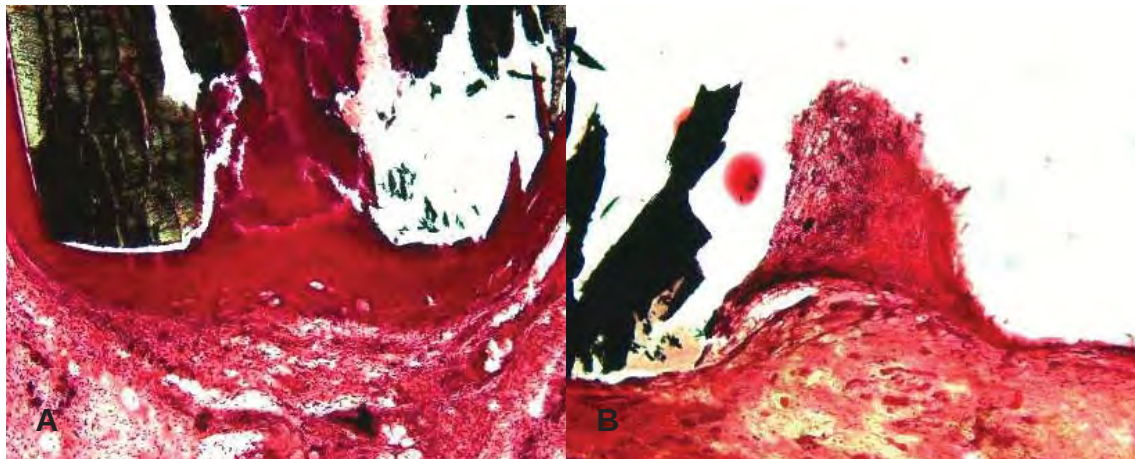


Figura 1. Grupo controle **(A)** 7 dias. Ausência de granulações Von kossa positivo próxima à abertura dos tubos (7dias, VK, 50x). **(B)** Ausência de granulações Von kossa positivo próxima à abertura dos tubos (30 dias, Vk, 100X).

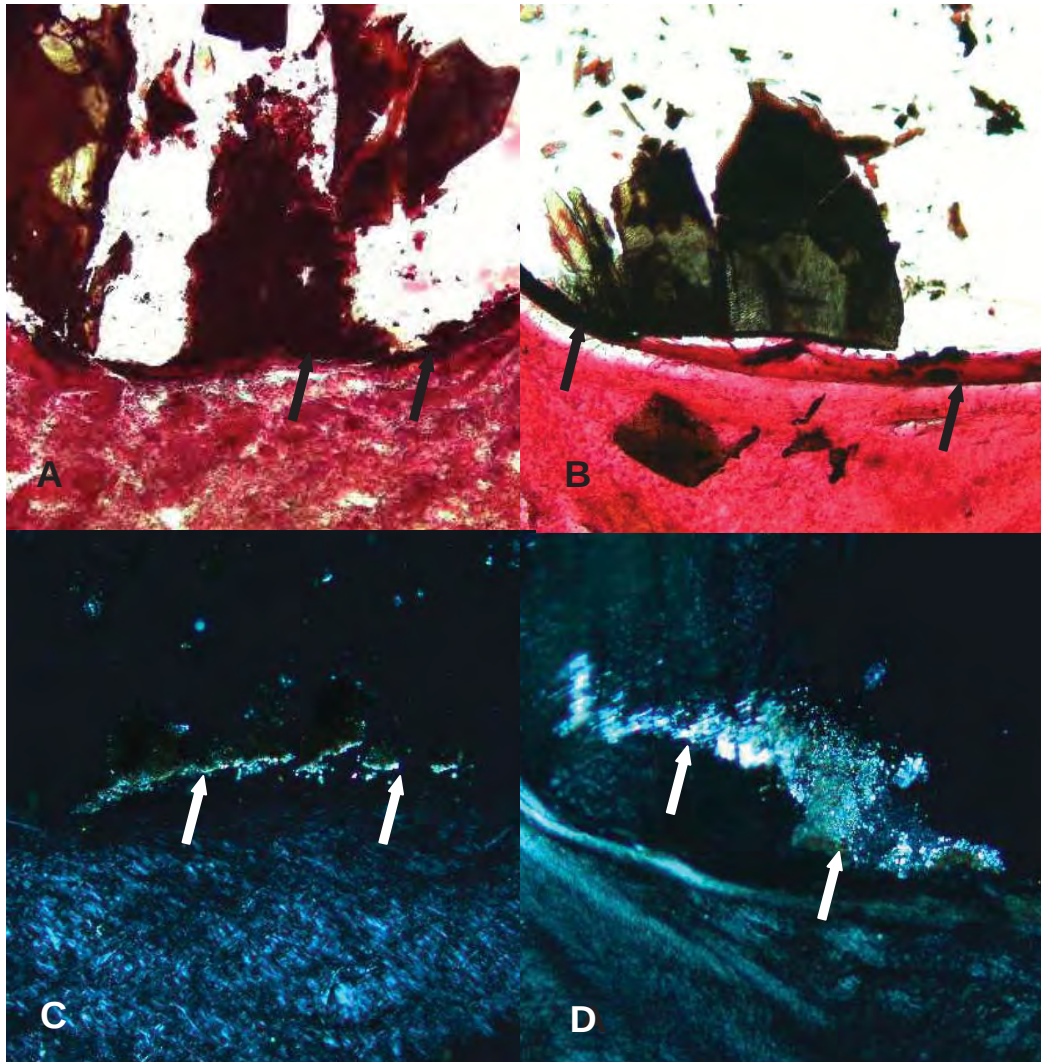


Figura 2. MTA **(A)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (7 dias, VK, 50x), **(B)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (30 dias, VK, 50x). **(C)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (7 dias, luz polarizada, 50x). **(D)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (30 dias, luz polarizada, 50x).

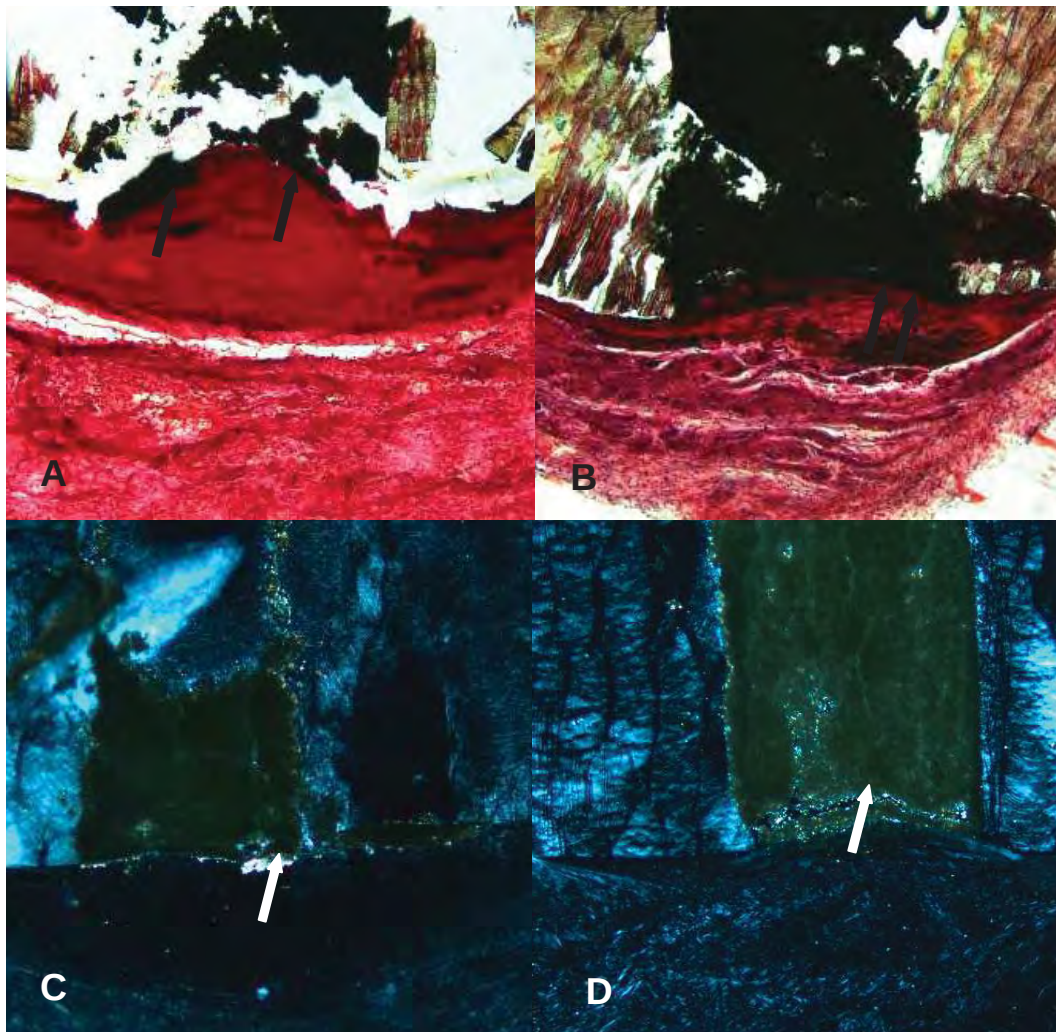


Figura 3. Sealapex **(A)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (7 dias, VK, 50x), **(B)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (30 dias, VK, 50x). **(C)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (7 dias, luz polarizada, 50x). **(D)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (30 dias, luz polarizada, 50x).

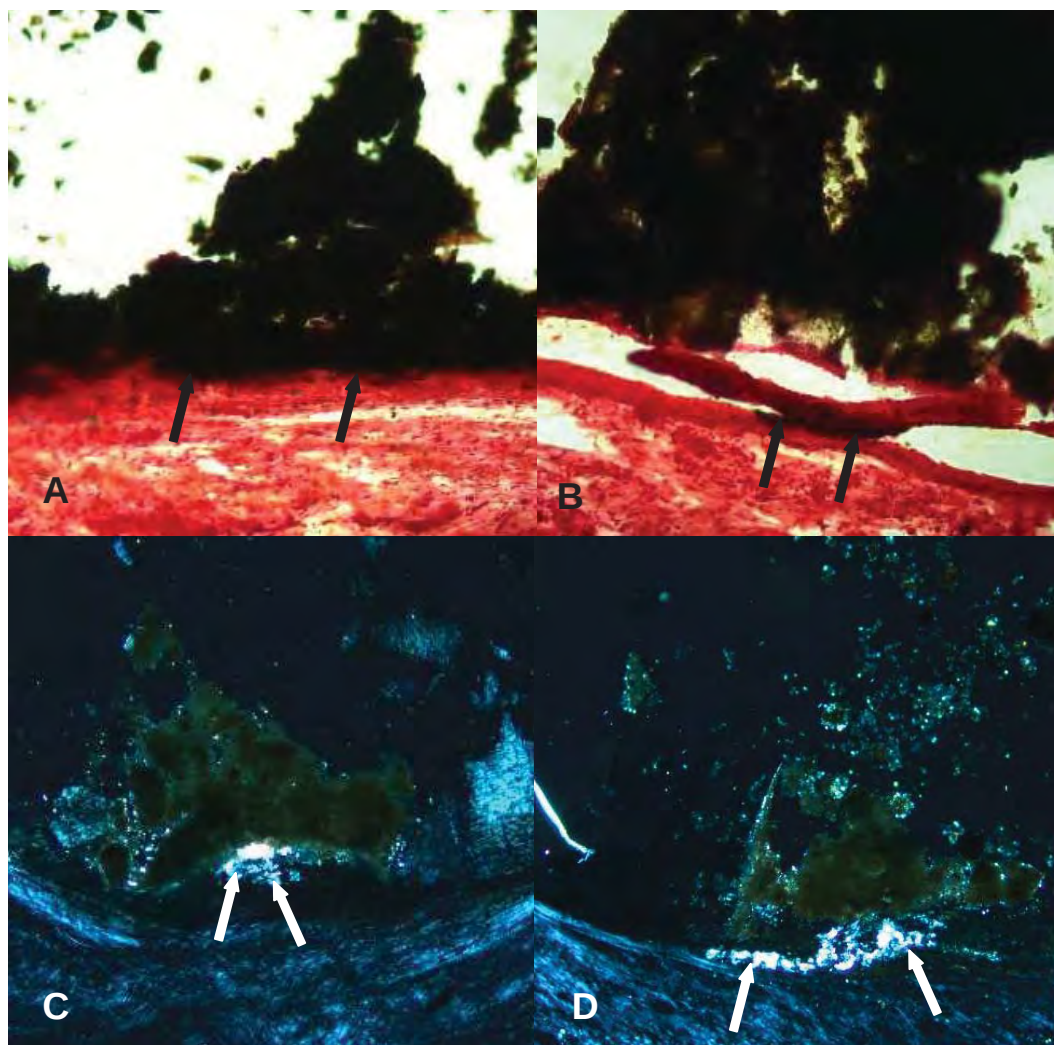


Figura 4. Sealapex plus **(A)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (7 dias, VK, 100x). **(B)** Observar tecido irregular Von kossa positivo (flechas) localizado próximo ao material (30 dias, VK, 100x). **(C)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (7 dias, luz polarizada, 100x). **(D)** Notar numerosas granulações (flechas), birrefringentes à luz polarizada (30 dias, luz polarizada, 100x).

Tabela 1- Escores relativos às características da cápsula fibrosa e ocorrência de calcificação ou de necrose para cada grupo e período experimental

MATERIAL	ESCORE		
	calcificação	necrose	cápsula
7 dias			
Sealapex	presente	presente	espessa
MTA	presente	presente	espessa
Sealapex Plus	presente	presente	espessa
Controle	ausente	ausente	espessa
30 dias			
Sealapex	presente	ausente	fina
MTA	presente	ausente	fina
Sealapex Plus	presente	ausente	fina
Controle	ausente	ausente	fina

1.5- *DISCUSSÃO*

Os tubos vazios utilizados no grupo controle promoveram pouca ou nenhuma reação no tecido subcutâneo e produziram reparo tecidual normal, semelhantes aos resultados encontrados na literatura (18,19).

Os resultados do grupo MTA estão em concordância com outros estudos que também utilizaram tubos de dentina preenchidos com o mesmo material e que foram implantados em tecido subcutâneo de rato (18,19). É conhecido que MTA não tem hidróxido de cálcio em sua composição (13). Entretanto, a mistura do pó com a água resulta em uma estrutura que contém basicamente óxido de cálcio e fosfato de cálcio (7). O óxido de cálcio pode reagir com fluidos teciduais para formar hidróxido de cálcio. As granulações birrefringentes observadas próximo ao MTA e dentro dos túbulos da parede dentinária são provavelmente cristais de calcita originadas da reação do cálcio do material com o dióxido de carbono do tecido conjuntivo (18).

A deposição de cristais de calcita parece ser muito importante para o mecanismo de ação do hidróxido de cálcio formado após a mistura do MTA com água. Seux et al (20) relataram uma rede extra celular de fibronectina em contato próximo a estes cristais sob incubação em meio de cultura sem células. Os autores concluíram que estes achados podem explicar o papel dos cristais de calcita e fibronectina como iniciadores na formação da barreira de tecido duro. Em nosso estudo foi observado uma barreira de tecido von Kossa-positivo próximo a estes cristais, bem como, a deposição de tecido duro em contato direto com MTA, como descrito em outro estudo (18). Este tecido duro é muito irregular em tecido subcutâneo (18,19), mas semelhante à dentina em

tecido pulpar (7,21), cimento em perfurações de furca (22,23) e tecidos perapicais (24,25,26).

Neste estudo, as mesmas estruturas encontradas no grupo que os tubos de dentina foram preenchidos com MTA, também foram observadas no grupo em que os tubos de dentina foram preenchidos com Sealapex plus. Áreas Von-Kossa positivo e estruturas birrefringentes à luz polarizada foram observadas demonstrando que esta combinação de materiais estimulou a formação de tecido mineralizado em tecido subcutâneo de rato.

Sealapex é um cimento a base de hidróxido de cálcio, e é possível observar as mesmas características biológicas e mecanismo de ação do hidróxido de cálcio e MTA (20). Os resultados do presente estudo, juntamente com outros estudos, corroboram a promoção de estruturas mineralizadas birrefringentes à luz polarizada ou Von Kossa positivo (19). Estas calcificações podem se originar a partir do óxido de cálcio presente no Sealapex que reage com os fluidos dos tecidos formando o hidróxido de cálcio. As granulações birrefringentes observadas próximas ao Sealapex são provavelmente cristais de calcita originados da reação dos íons cálcio com o dióxido de carbono dos tecidos (18). O processo de reparo do Sealapex está relacionado dentre outros à difusão de íons (9). Esta difusão de íons provenientes do cimento aumenta o pH da superfície radicular adjacente aos tecidos periodontais e favorecem o reparo (10). A alta solubilidade do Sealapex garante as características químicas e biológicas e a liberação de mais cálcio e íons hidroxila pode levar a indução da mineralização do ápice radicular (27). Entretanto, uma possível hipótese seria que a combinação do Sealapex com MTA pudesse alterar a solubilidade e a liberação de íons cálcio do material, prejudicando a deposição

de tecido duro, mas os resultados deste estudo mostram que esta hipótese não é válida, uma vez que estruturas birrefringentes à luz polarizada e estruturas Von Kossa-positivo continuaram ser observadas.

Em conclusão, os resultados observados sugerem que o Sealapex plus foi biocompatível e estimulou a mineralização de maneira semelhante àquela relatada para o MTA e Sealapex, mas outros estudos são necessários para comprovar sua utilização.

1.6- Referências bibliográficas

1. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. J Endod 1999;25:197-205.
2. Alhadainy HA, Himel VT. Evaluation of the sealing ability of amalgam, Cavit, and glass ionomer cement in the repair of furcation perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993; 75:362-6.
3. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a Mineral trioxide Aggregate when used as a root end filling material. J Endod 1993;19:591-5.
4. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. J Endod 1993;19:541-4.
5. Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. J Endod 1998;24:184-6.
6. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. J Am Dent Assoc 1996;127:1491-1496.
7. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 1995;21:349-53.
8. Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one-or-two-step apical barrier technique. J Endod 2004;30:876-9.
9. Tagger M & Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. Endod Dent Traumatol 1989;5:139-46.

10. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.
11. Byström 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;1:170-5.
12. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76-8.
13. Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PFE, de Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1977, 3:63-7.
14. Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol* 1988;4:241-52.
15. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T, Kirikale K, Turkey I. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:86-91.
16. Bernabé PFE, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Saito CTMH, Bernabé DG, Otoboni JA, Nery MJ. Evaluación in vitro de la capacidad selladora marginal de materiales retroobturadores: estudio del cemento Sealapex adicionado con MTA. *Med Oral* 2006;8:61-67.
17. Stanley HR. Toxicity testing of dental materials. Boca Raton, FL, CRC Press, 1985.

18. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Jr E.
Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. J Endod 1999;25:161-6.
19. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Bernabe FE, Filho JA, Junior ED, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. J Endod 2002;28:173-6.
20. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. Arch Oral Biol 1991;36:117-128.
21. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, Dezan Júnior E. Healing Process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or portland cement. Braz Dent J 2001;12:109-13.
22. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan E Jr. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. J Endodon 2001; 27:281-4.
23. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawan SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. Oral Surg 1995; 79:756-62.
24. Bernabe PF, Holland R, Morandi R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. Braz Dent J 2005;16:149-5.
25. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. J Endodon 1995; 21:603-8.

26. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasan SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. J Endodon 1997; 23:225-8.
27. Holland R, de Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. J Endod 1985;11:535-43.

Capítulo II

**Avaliação da viabilidade celular e produção
de citocinas induzida pelo MTA, Sealapex e
Sealapex plus**

Resumo

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do MTA, Sealapex e Sealapex plus (combinação entre Sealapex e MTA) sobre a viabilidade celular e a produção de citocinas por fibroblastos de camundongos (L929). **Métodos:** Fibroblastos foram semeados nos poços e estimulados por tubos de polietileno preenchidos com os cimentos. Tubos vazios foram utilizados como controle. Após 24 horas, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio colorimétrico de redução de MTT. O ensaio ELISA foi utilizado para avaliação da produção de IL-1 β e IL-6 por fibroblastos estimulados com os materiais. Os materiais foram inseridos no fundo da placa de 24 poços, condensados e deixados tomar presa por duas semanas em meio de cultura. Fibroblastos da linhagem L929 foram semeados e após 24 horas, os meios foram coletados e analisados para IL-6 e IL-1 β através do método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA com correção de Bonferroni. **Resultados:** MTA, Sealapex e Sealapex plus não foram citotóxicos ($p>0,05$). A produção de IL-6 e IL-1 β mostrou-se aumentada em todos os grupos em relação ao grupo controle ($p>0,05$). **Conclusão:** Em conclusão, MTA, Sealapex e Sealapex plus foram biocompatíveis em cultura de fibroblastos. Além disso, sugere-se que os materiais possam favorecer o processo de reparo pela liberação de IL-6 e IL-1 β .

Descritores: Citotoxicidade. Biocompatibilidade. Citocinas

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the effects of MTA, Sealapex and Sealapex plus (combination of Sealapex and MTA) on cell growth and cytokine production in mouse fibroblast (L929). **Methods:** The cell growth was determined with fibroblasts stimulated by polyethylene pipes filled with freshly manipulated material. Cell cultured without polyethylene pipes served as control. After 24- hour incubation, the cell viability was analyzed by MTT assay. ELISA was used for the evaluation of IL-1 β and IL-6 by fibroblasts stimulated with the materials. The materials were inserted in the deep of 24wells plates, condensed and were set for 2 weeks in DMEM medium. Wells without materials served as control. Fibroblasts (L929) were seed in the wells and incubated for 24 hours, when the medium was collected and analyzed for IL-1 β and IL-6. Statistical analysis was performed by ANOVA test and Bonferroni correction. **Results:** MTA, Sealapex and Sealapex plus did not inhibit the cell viability ($p>0,05$). It was detected IL-6 and IL-1 β production in all groups ($p>0.05$). **Conclusion:** In conclusion, MTA, Sealapex and Sealapex plus were biocompatible in mouse fibroblast, favoring the healing process with the production of IL-6 e IL-1 β .

Key-words: Cytotoxicity, Biocompatibility. Cytokines.

Capítulo 2

2.1- INTRODUÇÃO

Perfurações radiculares criadas iatrogenicamente durante o tratamento endodôntico ou como consequência de reabsorção radicular resultam em comunicação entre o espaço pulpar e os tecidos periodontais (1). Algumas variáveis podem afetar o prognóstico do reparo das perfurações, tais como: sua localização e tamanho, período de tempo entre o dano e o reparo, contaminação bacteriana, capacidade de selamento e biocompatibilidade do material utilizado (2). Em geral, materiais dentários devem ser biocompatíveis para minimizar os efeitos adversos produzidos pelo contato direto de seus componentes com tecidos periodontais e osso alveolar (3).

Métodos *in vitro* têm sido recomendados para avaliação da citotoxicidade dos materiais endodônticos. Alguns modelos experimentais são utilizados para esta finalidade. Dentre eles, as técnicas de cultivo celular (4) tendo como vantagens, ser um método relativamente barato e rápido para ser aplicado para diversos materiais (5). Diversas células de linhagem e fibroblastos derivados de humanos ou animais já foram utilizados para avaliar os efeitos citotóxicos de extratos, bem como espécimes de cimentos de canais radiculares (6,7,8,9,10,11,12,13). Fibroblastos são as células predominantes no tecido conjuntivo periodontal e são responsáveis pela formação e manutenção

*Este texto foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Endodontics (Anexo B)

das fibras do ligamento periodontal, bem como, envolvidos no reparo, remodelação e regeneração do osso e cimento adjacente (14).

Conceitos relacionados com imunotoxicologia estão sendo utilizados em modelos experimentais, tais como, a utilização de reagentes tóxicos para tentar entender a função do sistema imune. A avaliação do papel das citocinas vem sendo empregada para tal finalidade; estas moléculas são responsáveis pela regulação de uma variedade de processos incluindo imunidade, inflamação, apoptose e hematopoiese (15,16).

Os resultados obtidos em várias pesquisas favorecem o uso do MTA na Odontologia já que este possui capacidade de selamento e de regeneração do tecido periradicular, induz osteogênese e cementogênese e possui efeito mineralizador (17,18,19,20,21,22). Desta forma, o MTA tem uma influência significativa sobre os tecidos do sistema orofacial induzindo o processo de reparo. No entanto, o MTA possui algumas propriedades que não são ideais. O cimento resultante da mistura de pó com a água é difícil de manipular (23) e seu tempo de presa tem sido relatado como sendo de quase 3 horas, enquanto que o tempo de trabalho é inferior a 4 minutos (24).

O cimento endodôntico Sealapex (Sybron Endo Glendora, Califórnia, E.U.A.) é um cimento que contém hidróxido de cálcio em sua composição, sendo clinicamente favorável devido a sua influência positiva no processo de reparo (25,26). A difusão de íons do cimento no canal radicular eleva o pH na superfície da raiz adjacente aos tecidos periodontais, favorecendo a reparação (27), a ação antimicrobiana (28), a degradação bacteriana de lipopolissacarídeos (29), bem como, a indução da formação de tecido duro (30).

Uma combinação experimental entre Sealapex e MTA (Sealapex Plus) foi proposta no intuito de obter propriedades biológicas semelhantes às do MTA, mas com melhores propriedades de trabalho, tais como tempo de manipulação, de trabalho, facilidade de inserção e manutenção da capacidade de selamento marginal (31).

Embora esta combinação experimental aparentemente apresente características positivas, pois une dois materiais com características individuais adequadas, não existem estudos avaliando sua biocompatibilidade *in vitro*.

2.2- PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do MTA, Sealapex e Sealapex plus, (combinação entre Sealapex e MTA) sobre a viabilidade celular em fibroblastos (L929), bem como, avaliar os efeitos destes materiais sobre a liberação de IL-6 e IL-1 β .

2.3- MATERIAL E MÉTODO

Cultura de fibroblastos de camundongos

Células da linhagem de fibroblastos de camundongo L929 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, Md), 100µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de streptomicina, 50 µg/mL de gentamicina e 300 ng/mL de anfotericina B. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂. À medida que atingiram confluência, os fibroblastos foram utilizados nos ensaios.

Cimentos

Foram utilizados os seguintes materiais: MTA cinza (Ângelus Soluções em Odontologia, Londrina-Pr, Brasil), Sealapex (Sybron Endo, Glendora, USA) e Sealapex Plus (combinação entre Sealapex e MTA). Os cimentos foram preparados de acordo com instruções do fabricante. O Sealapex Plus foi obtido através de uma combinação de 0,15g de Sealapex e 0,5g de MTA.

Avaliação do efeito citotóxico dos cimentos MTA, Sealapex e Sealapex plus em cultura de fibroblastos

Para a avaliação da viabilidade celular dos materiais, o ensaio MTT foi escolhido. Fibroblastos (3×10^6 células/poço) foram distribuídos em placas de 24 poços em meio DMEM e mantidos a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas até atingirem confluência. Após este período, os fibroblastos foram utilizados nos ensaios. Tubos de polietileno com 1,1mm de diâmetro interno e 10mm de

comprimento foram preenchidos com os cimentos testados (BARD, CR bard Ltda Irlanda, Galway, Irlanda). Os tubos contendo MTA, Sealapex ou Sealapex plus foram colocados em um “insert” para evitar o contato direto entre os cimentos e as células. Para cada grupo experimental foram utilizados 6 poços e para o grupo controle foram utilizados tubos vazios. O tempo de estimulação foi de 24 horas, após este período, o meio foi descartado. A seguir, 90 µL de meio DMEM e 10 µL da solução MTT (5mg de 2,5-difenil brometo de tetrazolium e 1 mL de PBS) foi adicionada em cada poço. Os fibroblastos foram mantidos a 37°C com 5% de CO₂ por 4 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada. A seguir, foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico em cada poço e a placa foi mantida em mesa agitadora à temperatura ambiente por 30 minutos para dissolver os cristais azuis que coraram as mitocôndrias. Após essa etapa, a placa foi levada ao espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 570 nm, no qual a leitura de absorbância foi realizada (32).

Determinação da produção de citocinas por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para avaliação da liberação de IL-1β e IL-6 por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex ou Sealapex plus. Os materiais foram inseridos e condensados em placa de 24 poços (Corning) até atingirem aproximadamente 1 mm de espessura e o mesmo diâmetro dos poços. Os materiais foram deixados tomar presa por 2 semanas em meio de cultura DMEM a 37°C e 5% de CO₂, sendo que, o meio foi trocado diariamente durante esse período. Fibroblastos da linhagem L929

foram semeados nos poços (10^6 células/poço) contendo os materiais no fundo. Poços sem material, mas com fibroblastos serviram como controle. As placas foram incubadas por 24 horas. Após este período, os meios de cultura foram coletados e foi analisada a produção de IL-1 β e IL-6 por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus através do ensaio imunoenzimático ELISA (R & D Systems, Inc, Minneapolis, Minn), conforme indicação do fabricante.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph 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.

2.4- *RESULTADOS*

MTA, Sealapex e Sealapex Plus não inibiram a viabilidade celular. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$) entre os grupos experimentais e o grupo controle. Os resultados foram expressos pela média de absorbância (A_{570nm}) de cada material e do grupo controle (Fig 1).

A produção de IL-6 nos grupos MTA, Sealapex e Sealapex Plus mostrou-se aumentada em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle ($p>0,05$) (Fig. 2).

A produção de IL-1 β mostrou-se aumentada nos grupos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle ($p>0,05$) (Fig.3).

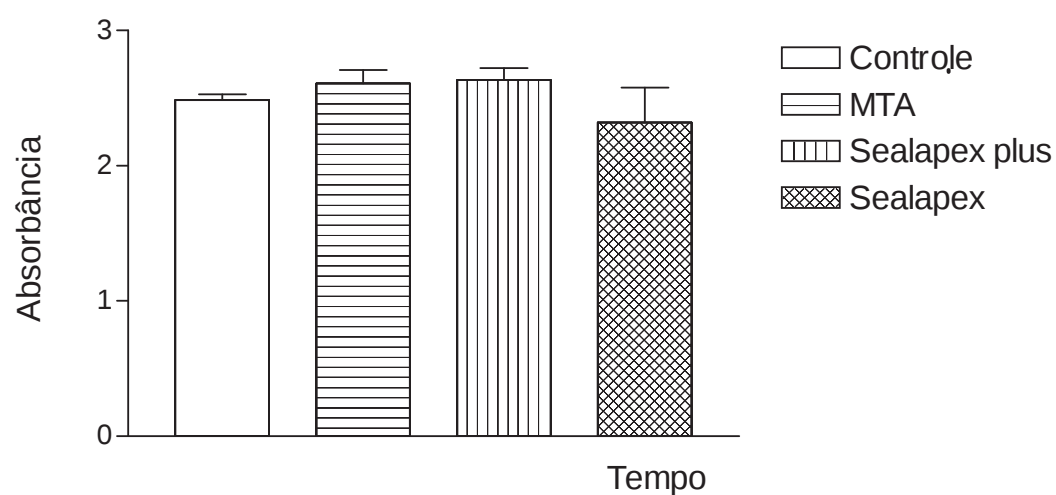


Figura 1- Viabilidade dos fibroblastos na presença de MTA, Sealapex e Sealapex plus, após estímulo de 24 horas. MTA, Sealapex e Sealapex Plus não inibiram a viabilidade celular. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

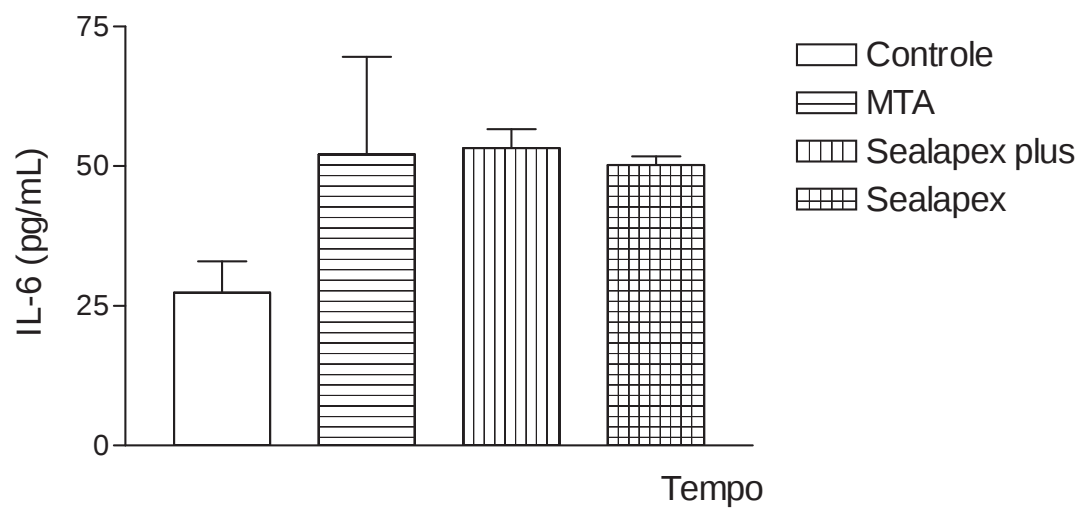


Figura 2- Liberação de IL-6 por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus (combinação entre MTA e Sealapex), após estimulação por um período de 24 horas. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

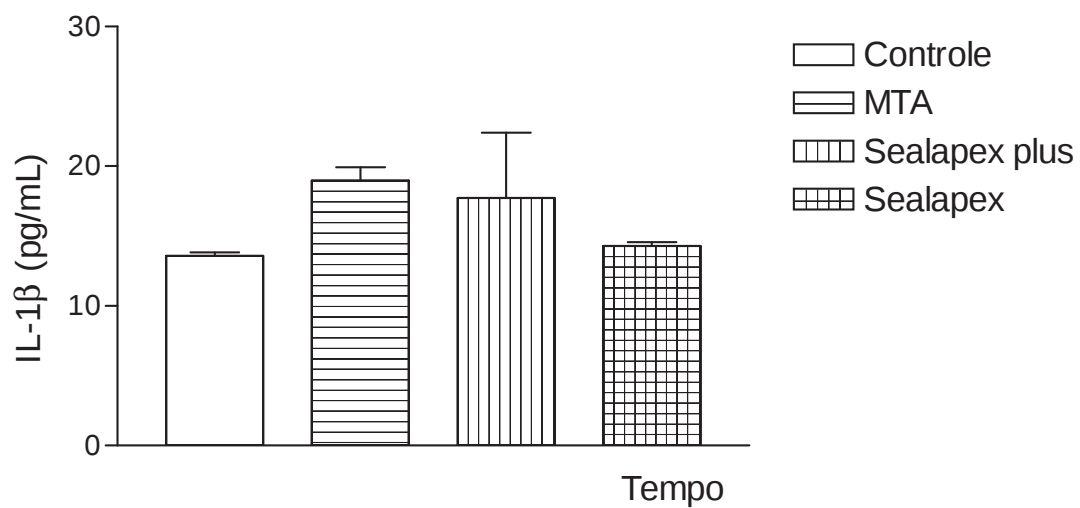


Figura 3- Liberação de IL-1 β por fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex plus (combinação entre MTA e Sealapex), após estimulação por um período de 24 horas. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com correção de Bonferroni).

2.5- *DISCUSSÃO*

Neste estudo, fibroblastos L929 foram utilizados para avaliar a biocompatibilidade de materiais endodônticos porque suas características em condições experimentais de cultura e sua relevância como modelo *in vitro* para o desenvolvimento de pesquisa envolvendo materiais endodônticos, já estão bem definidas (8,9,33). Modelos *in vitro* têm sido aplicados para determinar a resposta celular destes materiais, juntamente com testes de implantação e estudos *in vivo* (13).

Cultura de células é um método rápido e barato para avaliar a citotoxicidade dos materiais dentários. Estes estudos fornecem o passo inicial na avaliação da resposta das células aos cimentos. Testes *in vitro* são úteis na avaliação dos efeitos biológicos de cimentos endodônticos. Entretanto, devido a variações entre estudos, é difícil interpretar e comparar os resultados de pesquisas de cultura de células. Estudos *in vivo* e *in vitro* podem apresentar resultados conflitantes sobre a biocompatibilidade dos materiais. Por isso, é importante combinar resultados de ambos os tipos experimentais para o entendimento dos efeitos dos cimentos endodônticos sobre os tecidos perirradiculares (13).

Estudos têm demonstrado que o MTA promove reações teciduais favoráveis, caracterizado pela ausência de respostas inflamatórias severas e a indução do reparo tecidual pela formação de mineralização (20). Embora, as condições experimentais deste estudo tenham sido diferentes de outras pesquisas, nossos resultados concordam com trabalhos prévios que mostraram

que o MTA não foi tóxico em culturas de fibroblastos (9,34), osteoblastos like (12) e células de osteossarcoma (35).

O Sealapex foi empregado no presente estudo, como uma referência de cimento endodôntico contendo hidróxido de cálcio, por ter sido extensivamente estudado (27,28,29,30) e ser clinicamente utilizado em função do favorável processo de reparo observado com sua utilização (25,26). Este material não foi citotóxico comparado com o grupo controle. Os resultados deste trabalho discordam com outros trabalhos que demonstraram que o Sealapex foi citotóxico (10,35). O resultado pode estar relacionado com o pH elevado do Sealapex após a mistura (36,37). A liberação de íons deve ser interpretada de acordo com o modelo experimental utilizado. Entretanto, produtos com hidróxido de cálcio são mais citotóxicos do que outros materiais em cultura de células (10,37), apesar disso, estimulam o reparo através de deposição de tecido mineralizado quando avaliado in vivo (26,30).

O Sealapex plus não foi citotóxico neste estudo. É possível que esta combinação tenha propriedades biológicas semelhantes ao MTA que não foi citotóxico neste estudo e em outros (9,11,23,38). Embora esta combinação experimental de dois materiais com propriedades biológicas favoráveis e características positivas, outros estudos e metodologias são necessárias para confirmar o benefício deste material.

Vários efeitos imunotóxicos resultantes da exposição celular a materiais dentários têm sido relatados, estes efeitos podem ter sido de um organismo específico, célula específica, função imune específica, efeito essencialmente secundário seguido de efeitos tóxicos anteriores de outros organismos ou eles podem ser simplesmente efeitos não específicos. (39). Praticamente todas as

situações em que ocorreu um dano celular significativo como um resultado de exposição química a tecidos biológicos, tais danos celulares aumentaram a inflamação, migração celular e agregação ao lugar do dano, e acredita-se que o controle molecular para estas reações são as citocinas (40 Foster). Aqui, a monitoria da concentração de citocina no local do dano parece representar o potencial para monitorar a extensão da citotoxicidade extraída do local por um agente específico (40).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizado para avaliar a produção de citocinas é muito sofisticado (16). A avaliação das citocinas sob tais condições experimentais parece fornecer quantificação adequada dos níveis relativos de biocompatibilidade ao nível bioquímico dos materiais testados (16).

IL-1 β é uma citocina que medeia a reabsorção óssea. É sintetizada por várias células, assim como macrófagos próximos a reabsorção óssea e osteoclastos (41). Estudos têm demonstrado que osteoblastos estimulados por MTA produzem IL-1 β (42,43). Neste estudo, fibroblastos estimulados por MTA, Sealapex e Sealapex Plus produziram IL-1 β , entretanto esta produção não foi estatisticamente significativa comparando ao grupo controle. É possível que para a produção de IL-1 β seja necessário um estímulo maior do que para outras citocinas e devido à quantidade de cimento utilizada, esta não teria sido suficiente para estimular a produção de IL-1 β .

IL-6 é uma citocina que medeia a resposta do hospedeiro para a injúria e infecção, sendo secretada durante o processo inflamatório com a finalidade de regular vários aspectos da resposta imune, fase aguda da reação, hematopoiese e controle de infecção (44). Animais depletados de IL-6 mostraram lesões periapicais mais amplas que ratos normais (44). Outros tipos

celulares, como osteoblastos na presença de MTA produziram altas concentrações de IL-6 (45,46). De acordo com os resultados encontrados, todos os materiais liberaram IL-6 mostrando que todos têm um papel importante no controle da inflamação e no favorecimento do processo de reparo.

Em conclusão, MTA, Sealapex e Sealapex plus foram biocompatíveis em cultura de fibroblastos. Além disso, sugere-se que os materiais possam favorecer o processo de reparo pela liberação de IL-6 e IL-1 β .

2.6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Sinai IH. Endodontic perforations: their prognosis and treatment. J Am Dent Assoc 1977;95:90-5.
- 2-Makkawy HA, Koka S, Lavin MT, Ewoldsen NO. Cytotoxicity of root perforation repair materials. Endod 1998;24:477-9.
- 3-Souza NJ, Justo GZ, Oliveira CR, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. Int Endod J 2006;39:40-7.
- 4-Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. J Endod 2002;28:749-53.
- 5-Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. Int Endod J 1997;30:141-4.
- 6-Arenholt-Bindslev D, Hörsted-Bindslev P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. Endod Dent Traumatol 1989;5:219-26.
- 7-Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. J Endod 1989;15:60-7.
- 8-Beltes P, Koulaouzidou E, Kotoula V, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. Endod Dent Traumatol 1995;11:245-9.
- 9-Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod 1998;24:91-6.

- 10-Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod* 2000;26:328-30.
- 11- Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002;35:153-8.
- 12-Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E, Granchi D, Nanni M, Pagani S, et al. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:167-73.
- 13-Al-Awadhi S, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Cultured primary osteoblast viability and apoptosis in the presence of root canal sealers. *J Endod* 2004 ;30:527-33
- 14-Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000;24:28–55.
- 15-Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;37:432-9.
- 16-Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:123-8.
- 17-Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-5.
- 18-Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.

- 19-Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:756-63.
- 20-Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, de Moraes Costa MM, Cannon M.. Mineral Trioxide Aggregate but not light-cure Mineral Trioxide Aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008;34:62-5.
- 21-Bernabe PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE . Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J* 2005;16:149-55.
- 22-Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabe PFE, Otoboni Filho JA, Dezan-Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12:3-8.
- 23-Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995;21:489-92.
- 24-Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod* 2004;30:876-9.
- 25-Holland R, Otoboni Filho JA, 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;9:67-76.
- 26-Tagger M & Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:139-46.

- 27-Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. J Endod 1981;7:17-21.
- 28-Byström 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;1:170-5.
- 29-Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod 1993;19:76-8.
- 30-Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PFE, de Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. J Endod 1977, 3:63-7.
- 31-Bernabé PFE, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Saito CTMH, Bernabé, DG, Otoboni JA, Nery MJ. Evaluación in vitro de la capacidad selladora marginal de materiales retroobturadores: estudio del cemento Sealapex adicionado con MTA. Med Oral 2006;8:61-67.
- 32-Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55-63.
- 33-Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Apr;95(4):483-9.
- 34-Pistorius A, Willershausen B, Briseno Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. Int Endod J 2003;36:610-5.

- 35-Bonson S, Jeansone BG, Lallier TE. Root-end filing materials alter fibroblast differentiation. J Dent Res 2004;83:408-13.
- 36-Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T, Kirikale K, Turkey I. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007;103:86-91.
- 37-Huang TH, Ding SJ, Hsu Tz. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. J Mater Sci Mater Med 2004;83:408-13.
- 38-Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Jantararat J, Korre S. Biocompatibility of furcal perforation repair material using cell culture technique: Ketac Molar versus ProRoot MTA. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102: 48-50.
- 39-Wood SC, Karras JG, Holsapple MP. Integration of the human lymphocyte into immunotoxicological investigations. Fundam Appl Toxicol. 1992 Apr;18(3):450-9.
- 40-Foster JR. The functions of cytokines and their uses in toxicology. Int J Exp Pathol. 2001 Jun;82(3):171-92. Review.
- 41-Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. Int Endod J 1998;31:311-25.
- 42-Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, Desjardins LA, Heeley JD. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. J Bone Miner Res 1987;2:559-65.

- 43-Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002;23:4001-10.
- 44-Huang GT-J, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:83-8.
- 45-Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999;20:167-73.
- 46-Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998;24:543-7.

Anexos

Anexo A- Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E CITOTOXICIDADE DO Sealapex Plux"**, sob responsabilidade do **Prof. Dr. JOÃO EDUARDO GOMES FILHO** e colaboração de **ALESSANDRA CRISTINA GOMES** e **SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 30 de maio de 2008 de acordo com o protocolo no. 2008-007891.

Araçatuba, 31 de julho de 2008

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Anexo B- Normas do Periódico Journal of

Endodontics

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

1. The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.
2. **General Points on Composition** Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
 - a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c”, below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
 - b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)”. In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.
 - c. Sentences are stronger when written in the active voice, i.e., the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study

to be a factor that was associated with reduced inflammation”, can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation”. Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, Endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method”, can be edited to “Formerly, Endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation”. The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used”, can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study”.

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

General Points on the Organization of Original Research Manuscripts

a. **Title Page:** The title should describe the major conclusion of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org).

b. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (150 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly.

This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

- c. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to provide sufficient detail. However, many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals.
- d. **Material and Methods:** The objective of the methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The three components to this section are the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the particular aspects used in the present study. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript should state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. Studies on humans should conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB approved the protocol and that informed consent was obtained. Studies involving animals should state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis, drop-outs from clinical trials, etc.
- e. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study. Do not include all available data without justification, any repetitive findings will be rejected from publication. All Figs./Charts/Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

Figures: There are two general types of figures. The first type of figure includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-

width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing on your part given the small size of each panel, you will only be able to illustrate the most important feature of each photomicrograph. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., “A”, “B”, etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Chang, et al, (*JOE* 28:90, 2002), Hayashi, et al, (*JOE* 28:120, 2002) and by Davis, et al (*JOE* 28:464, 2002). At the Editor’s discretion, color figures may be published at no cost to the authors. However, the Editor is limited by a yearly allowance and this offer does not include printing of reprints.

The second type of figure are graphs (i.e., line drawings) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables: Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

- f. **Discussion:** The conclusion section should describe the major findings of the study. Both the strength and weaknesses of the observations should be discussed. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions? How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion.
- g. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be efficiently learned from reading past issues of the *JOE*. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

4. Page Limitations for Manuscripts in the Category of Basic Science/Endodontic Techniques

- a. **What is the limitation?** Original research reports in the category of basic science/endodontic techniques are limited to no more than 2,000 words (total for the abstract, introduction, methods, results and conclusions), and a total of three Figs./Charts/Tables. If a composite figure is used (as described above), then this will count as two of the three permitted Figs./Charts/Tables.
- b. **Does this apply to me?** Manuscripts submitted to the *JOE* can be broadly divided into several categories including review articles, clinical trials (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies), basic science/biology (animal or culture studies on biological research related to endodontics, or relevant pathology or physiology), and basic science/techniques (e.g., stress/strain/compression/strength/failure/composition studies on endodontic instruments or materials). Manuscripts submitted in this last category are the only category subject to these limitations. If you are not sure whether your manuscript falls within this category please contact the Editor by e-mail at jendodontics@uthscsa.edu.
- c. **Why page limitations?** Most surveyed stakeholders of the *JOE* desire timely publication of submitted manuscripts and an extension of papers to include review articles and other features. To accomplish these goals, we must reduce the average length of manuscripts since increasing the *JOE*'s number of published pages is prohibitively expensive. Although a difficult decision, restricting this one category of manuscripts accomplishes nearly all of these goals since ~40-50% of published papers are in this category.
- d. **How do I make my manuscript fit these limitations?** Adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the

resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor will reject manuscripts that exceed these limitations.

5. Available Resources:

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X

- . Day R.. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9
- a. Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar)
- b. Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
- c. Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

ANEXO C- – Referências – Introdução Geral

1- Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 78: 368-74.

2- Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. J Endod 1999; 25: 197-205.

3- Costa CAS; Souza PPC. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: Estrela, C. Metodologia Científica. São Paulo: Artes Médicas, 2005:213-2303.

4- Alhadainy HA, Himel VT. Evaluation of the sealing ability of amalgam, Cavit, and glass ionomer cement in the repair of furcation perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 75:362-6.

5- Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a Mineral trioxide Aggregate when used as a root end filling material. J Endod 1993;19:591-5.

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

7- Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. J Am Dent Assoc 1996;127:1491-4.

8- Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. J Endod 2001;27:281-4.

9- Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, Dezan Júnior E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. Braz Dent J 2001;12:109-13.

10- Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. J Endodon 1995; 21:603-8.

11- Bernabé PFE, Holland R. MTA e cimento Portland: Considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas. In: Cardoso, RJA & Machado, MEL. Odontologia Arte e Conhecimento. São Paulo: Artes Médicas, 2003:225-264.

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

13- Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J 2000;11:3-9.

14- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. J Endod 1993;19:541-4.

15- Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. J Endod. 1998;24:184-6.

- 16- Adamo HL, Buruiana R, Schertzer L, Boylan RJ. A comparison of MTA, Super-EBA, composite and amalgam as root-end filling materials using a bacterial microleakage model. *Int Endod J* 1999;32:197-203.
- 17- Tang HM, Torabinejad M, Kettering JD. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. *J Endod* 2002;28:5-7.
- 18- Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one-or-two-step apical barrier technique. *J Endod* 2004;30:876-9.
- 19- Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Silva RS, Assed S, Guimarães LFL. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J* 1997;30:205-9.
- 20- Cobankara FK, Orucoglu H, Sengun A, Bellt S. The quantitative evaluation of apical sealing of four endodontic sealers. *J Endod* 2006;32:66-8.
- 21- Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of acroseal sealer in comparison with apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:86-91.
- 22- Holland R, Mello W, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JA. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães após a obturação de canal com Sealapex acrescido ou não de iodofórmio. *Rev. Odont. UNESP* 1990;19:97-104.
- 23- Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2003;36:527-32.
- 24- Yücel AÇ, Güler E, Güler AU, Ertas E. Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers. *J Endod* 2006;32:890-3.

25- Bernabé, PFE, Tavares LAC, Gomes-Filho JE, Saito CTMH, Bernabé DG, Otoboni Filho JA, et al. Evaluación in vitro de la capacidad selladora marginal de materiales retroobturadores: estudio del cemento Sealapex adicionado com MTA. Med Oral 2006;8:61-7.